

CARACTÉRISATION STRUCTURALE DE L'APTAMÈRE
DU RIBORÉGULATEUR SAM-I

par

Julien Boudreault

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, août 2016

Le 31 mars 2016, le jury a accepté le mémoire de Monsieur Julien Boudreault dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur Daniel Lafontaine
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Martin Bisaillon
Évaluateur interne
Département de biochimie

Professeur Sébastien Rodrigue
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

La détermination de la structure d'une molécule dans une cellule est souvent la première étape à la compréhension de son mode d'action. Un exemple flagrant est le riborégulateur, qui est un ARN hautement structuré capable de lier un ligand et de modifier la régulation génique chez les bactéries. Cette étude se penche sur la structure de l'aptamère d'un riborégulateur pouvant se lier au métabolite S-adénosylméthionine (SAM), qui est impliqué dans des réactions de méthylations essentielles dans une cellule. Plus précisément, le modèle sélectionné pour ces travaux provient de la famille SAM-I et est composé de quatre tiges (P1 à P4). En utilisant des techniques biophysiques telles le FRET et le single-molecule FRET (sm-FRET), nous pouvons comprendre plus en détails le dynamisme structural du repliement de l'aptamère qui se passe en deux étapes. La première étape de repliement de l'aptamère est constituée par la formation de l'état intermédiaire induite par la liaison du magnésium. Cet état a été caractérisé grâce à des mutations nucléotidiques bloquant des changements conformationnels spécifiques. Aussi, cette étude a permis d'ajouter des détails biophysiques sur la dernière étape de repliement de l'aptamère induite par la liaison de SAM. La réorganisation finale du site de liaison implique une rotation de la tige P1. D'ailleurs, la formation de la tige P1 permet le contrôle direct de l'expression génétique. Ces deux étapes permettent à l'aptamère du riborégulateur SAM d'adopter sa structure native essentielle à l'arrêt de transcription. En bref, nous décrivons en détail les mécanismes structuraux expliquant le fonctionnement du riborégulateur SAM. Certains de ces mécanismes pourraient être communs à plusieurs classes de riborégulateurs, d'où l'intérêt de prospecter d'autres cibles.

Mots clés : Riborégulateurs, structure de l'ARN, expression génétique, bactérie

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Daniel Lafontaine de m'avoir choisi pour travailler dans son laboratoire. Ce fut trois belles années d'apprentissage ainsi qu'une opportunité d'avoir effectué un stage outre-mer en Écosse avec Carlos Penedo, que je tiens à remercier également. Je suis me sens choyé et accompli d'avoir pu apprendre et partager tellement de connaissance dans le labo au travers de mon parcours scolaire d'études supérieures. Je vous souhaite énormément de succès pour les futures années! Je voudrais remercier mes conseillers Martin Bisailon et Sébastien Rodrigue d'avoir offert leur soutien et leur savoir lors de ma maîtrise.

Je tiens à remercier tous les gens du labo également, spécialement Patrick St-Pierre qui m'a accueilli et formé pour pratiquement tout! Merci à tous mes collègues qui ont laissé des traces dans le laboratoire (Anthony, Erich, Max, Marie-Ann), et à ceux qui sont encore là en ce moment (Patrick, Laurène, J-F, Seb, Adrien, Anne-Marie, Fred, Fatima, Mélanie, Marc-André, Pierre, Jonathan, Auréliane et Élodie, lâchez-pas gang!) Je voudrais souligner un remerciement pour les membres du département, avec qui beaucoup de partages de connaissance ont eu lieu.

Merci à ma famille, maman, papa, P-O et Math Boud, à qui j'envoie beaucoup d'amour et de sincérité. Je tiens à souligner la tendre présence de monoureuse Laïa Julio à qui j'ai eu la chance d'emménager avec au cours des derniers kilomètres de ma maîtrise. Tu m'as énormément soutenu et je t'envoie tout plein d'amour. Je voudrais également remercier tous mes amis, à qui j'ai eu un soutien moral qui m'a aidé à passer au travers de ma maîtrise.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	I
REMERCIEMENTS.....	II
TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1. Les acides nucléiques.....	1
1.1.1 Principe de base de la biologie moléculaire.....	1
1.1.2 Le contrôle de l'expression génétique.....	2
1.1.3 Importance de la structure de l'ARN : Exemple de l'ARNt.....	4
1.1.4 Importance de l'étude du repliement en temps réel d'un ARN : Exemple de la translocation de l'ARNt dans le ribosome.....	6
1.1.5 Importance du repliement d'un ARN en cours de transcription : Exemple de la ribonucléase P.....	9
1.2. Les riborégulateurs.....	11
1.2.1 Caractéristiques générales des riborégulateurs.....	11
1.2.2 Le contrôle de l'expression génétique par les riborégulateurs.....	13
1.2.2.1 La terminaison Rho-indépendante.....	14
1.2.2.2 La terminaison Rho-dépendante.....	15
1.2.2.3 Mécanisme de régulation traductionnelle.....	16
1.3. Le riborégulateur SAM-I.....	18
1.3.1 S-adénosylméthionine et S-adénosylhomocystéine.....	18
1.3.2 Découverte du riborégulateur SAM-I (S-box).....	20
1.3.3 Contrôle de l'expression génétique par SAM-I.....	21
1.3.4 Détails de la structure de l'aptamère du riborégulateur SAM-I.....	21
1.3.5 Mécanisme de repliement de l'aptamère du riborégulateur SAM-I en deux étapes.....	24
1.4. Étude du mécanisme de repliement de l'aptamère du riborégulateur SAM-I à l'échelle de la molécule unique.....	27
1.4.1 Principes du transfert d'énergie par résonance de type Förster.....	27
1.4.2 Principes du transfert d'énergie par résonance de type Förster à l'échelle de la molécule unique (sm-FRET).....	31
1.5 Objectifs de maîtrise.....	33

1.5.1 Caractériser l'état intermédiaire (F_{Mg}) de l'aptamère du riborégulateur SAM-I pour <i>yitJ</i> et <i>fn02</i>	33
1.5.2 Caractériser la rotation de la tige P1 de l'aptamère du riborégulateur SAM-I.....	34
CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	36
2.1. Préambule et présentation de l'article scientifique.....	36
2.2. Abstract.....	38
2.3. Introduction.....	39
2.4. Material and methods.....	44
2.5. Results.....	48
2.6. Discussion.....	61
2.7. Acknowledgement.....	65
2.8. Funding.....	65
2.9. References.....	65
CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	69
3.1. Discussion générale.....	69
3.2. Conclusion.....	73
ANNEXES.....	75
BIBLIOGRAPHIE.....	77

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Adénine
AT	Paire de base Adénine et Thymine
AU	Paire de base Adénine et Uracile
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	Acide désoxyribonucléique double brin
AdoCbl	Adénosylcobalamine ou vitamine B ₁₂
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non codant
ARN pol	ARN polymérase
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
°C	Degré Celsius
C	Cytosine
Cy3	Cyanine 3 (essais de FRET)
Cy5	Cyanine 5
CGE	Électrophorèse comparative sur gel (<i>comparative gel electrophoresis</i>)
c-di-GMP	Guanosine monophosphate cyclique
CoB ₁₂	Coenzyme B ₁₂
E _{FRET}	Efficiencence de FRET
F	Fluorescéine (essais de FRET)
f	Femto (10 ⁻¹⁵)
F _{MG}	État intermédiaire de SAM-I, préorganisation du site de liaison, état magnésium
FMN	Flavine mononucléotide

F _{NS}	État natif de SAM-I (native state)
FRET	Transfert d'énergie par résonance de fluorescence (<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>)
G	Guanine
GC	Paire de base Guanine et Cytosine
g	Gramme
GlcN6P	Glucosamine-6-Phosphate
IDT [®]	<i>Integrated DNA Technologies</i> [®]
Jct	Jonction
K _d	Constante de dissociation
L	Litre
<i>LacZ</i>	Gène encodant pour la β-galactosidase, permettant l'hydrolyse du lactose
M	Molaire
m	Milli (10 ⁻³)
[Mg ²⁺] _½	Concentration apparente de magnésium où la moitié du repliement induit par le magnésium est effectué dans la population de molécules
MgCl ₂	Chlorure de magnésium (<i>magnesium chloride</i>)
Moco	Cofacteur du molybdène
NaCl	Chlorure de sodium (<i>sodium chloride</i>)
nm	Nanomètre (10 ⁻⁹ mètre)
nt	Nucléotide
ONPG	Ortho-nitrophényl-β-galactoside
Opéron <i>lac</i>	Opéron lactose
Opéron <i>trp</i>	Opéron tryptophane
P1	Tige 1 (<i>paired 1</i>)
P2	Tige 2 (<i>paired 2</i>)
P3	Tige 3 (<i>paired 3</i>)
P4	Tige 4 (<i>paired 4</i>)

p	Pico (10^{-12})
pARNi	Petit ARN interférents
pb	Paire de bases
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potentiel hydrogène
Pré-Q1	Pré-queosine1 ou 7-aminomethyl-7-deazaguanine
R	Purine (adénine ou guanine)
rNTP	Ribonucléotides (rATP, rCTP, rGTP, tUTP)
rATP	Ribonucléotide adénosine triphosphate
rCTP	Ribonucléotide cytosine triphosphate
rGTP	Ribonucléoside guanosine triphosphate
RBS	« Ribosome binding site » (site de liaison du ribosome)
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
RNase	Ribonucléase
rNTP	Ribonucléotide triphosphate
rUTP	Ribonucléotide uracile triphosphate
SAH	S-adénosylhomocystéine
SAM	S-adénosylméthionine (voir aussi S)
SD	Séquence Shine-Dalgarno
Sm-FRET	Single-molecule FRET, FRET à l'échelle de la molécule unique
TPP	Thiamine pyrophosphate
Tuco	Cofacteur du tungstène
U	Uracile
UTR	Région non transcrite (<i>untranslated region</i>)
5-NU	Groupe amino-allyle en 5' d'un uracile
μ	Micro (10^{-6})

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Familles des riborégulateurs liant SAM.....	19
Tableau 1.2	Propriétés spectroscopiques de fluorophores utilisés pour des expériences de FRET.....	28

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Principe de base de l'expression génétique.....	2
Figure 1.2	Régulation de l'expression de l'opéron lactose chez <i>E.coli</i>	3
Figure 1.3	Représentation de la structure de l'ARNt.....	6
Figure 1.4	Mécanisme de translocation traductionnelle en 3 étapes	9
Figure 1.5	Schéma du repliement de l'ARN circulairement permuté de la RNase P en présence/absence du facteur d'élongation NusA durant la transcription.....	10
Figure 1.6	Représentation générale d'un ARNm contenant un riborégulateur.....	12
Figure 1.7	Mécanismes de régulation génétique des riborégulateurs.....	17
Figure 1.8	Représentation de SAM et SAH.....	20
Figure 1.9	Structure secondaire et tertiaire du riborégulateur SAM-I.....	24
Figure 1.10	Mécanisme de repliement de l'aptamère du riborégulateur SAM-I.....	26
Figure 1.11	Changements conformationnels de SAM-I entre 3 états ($F_U \rightarrow F_{Mg} \rightarrow F_{NS}$) en présence de magnésium.....	26
Figure 1.12	Transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET).....	31

Figure 1.13	Schéma d'un échantillon fluorescent immobilisé sur une lame de microscope utilisant des interactions non covalentes entre de l'albumine bovine biotinylée (BSA) et la streptavidine pour une expérience de sm-FRET.....	33
Figure 2.1	Representation of SAM aptamer and its folding mechanism induced by ion and ligand binding.....	43
Figure 2.2	Single-molecule FRET analysis of the P1-P3 folding transition of <i>yitJ</i> and <i>fn02</i> with vector 1-3.....	50
Figure 2.3	Single-molecule FRET analysis of the P1-P3 folding transition of <i>yitJ</i> mutants with vector 1-3.....	52
Figure 2.4	Single-molecule FRET time trajectories and histograms of <i>yitJ</i> and <i>fn02</i> vector 1-3 in the presence of Mg^{2+}	53
Figure 2.5	Single-molecule FRET analysis of the P1-P3 folding transition of <i>fn02</i> mutants with vector 1-3.....	57
Figure 2.6	Presence of P4 stem affects the core aptamer folding.....	60
Figure 2.7	SAM binding is dependent of pseudoknot formation.....	61
Figure 3.1	Figure 3.1 : Fusion transcriptionnelle d'un gène X avec celui de la β -galactosidase.....	73
Figure A.1	Caractérisation de la phase ondulatoire de la rotation de la tige P1 par CGE.....	75

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Les acides nucléiques

1.1.1 Principe de base de la biologie moléculaire

La découverte de la structure de l'acide désoxynucléique (ADN) en 1953 fut probablement une des plus grandes avancées de la biologie moléculaire (Watson and Crick, 1953). Suite à cette découverte, la théorie selon laquelle l'acide ribonucléique (ARN) servirait d'intermédiaire entre l'ADN et les protéines commençait à émerger dans la communauté scientifique. Ce n'est qu'en 1961 que la fonction d'un ARN a été caractérisée : l'ARN messager (ARNm) possède la capacité d'interagir avec le ribosome ce qui permet la traduction de protéines (Jacob and Monod, 1961). C'est à ce moment que l'ARN s'est officiellement inséré dans le principe de base la biologie moléculaire **ADN → ARNm → Protéine** (voir Fig. 1.1), représentant l'expression génétique. Selon ce principe, l'information génétique contenue dans l'ADN est copiée sous forme d'ARNm par la transcription. Ensuite, l'information génétique contenue dans l'ARNm est lue par les ribosomes, qui participent à la traduction de protéines. De nombreuses réactions biochimiques sont catalysées par les protéines, ce qui permet la production de composés organiques (métabolites) qui assurent le bon fonctionnement d'une cellule (voir Fig. 1.1).

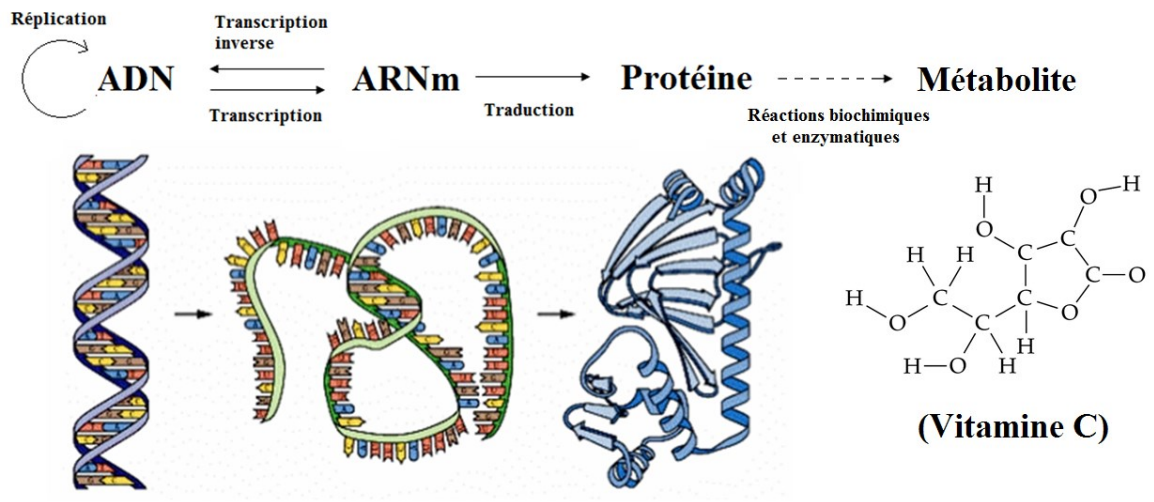


Figure 1.1. Principe de base de l'expression génétique. Les flèches pleines représentent les étapes d'expression génétique menant de l'ADN à la formation d'une protéine. La flèche pointillée représente les réactions enzymatiques permettant la formation de métabolites.

1.1.2 Le contrôle de l'expression génétique

La régulation de l'expression des gènes est essentielle pour l'homéostasie des organismes vivants. Comme exemple, l'opéron lactose est contrôlé de manière à optimiser l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme et le transport du lactose lorsqu'une carence de glucose survient. En absence de lactose, un répresseur protéique se lie à l'opérateur de l'opéron, bloquant la transcription des gènes de l'opéron qui sont impliqués dans le métabolisme du lactose (voir Fig. 1.2A). Une économie énergétique se fait étant donné que les ARNm des enzymes ne sont pas synthétisés inutilement et que la séquence codant pour la protéine n'est pas lue par les ribosomes. En présence de lactose (et en carence de glucose), un métabolite inducteur (allolactose) issu du catabolisme du lactose par le gène *lacZ* de l'opéron se lie au répresseur (voir Fig. 1.2B). Cette liaison entraîne un changement de structure allostérique du répresseur et l'empêche de se lier à l'opérateur, ce qui permet à la polymérase de transcrire les gènes de l'opéron (Jacob and Monod, 1961).

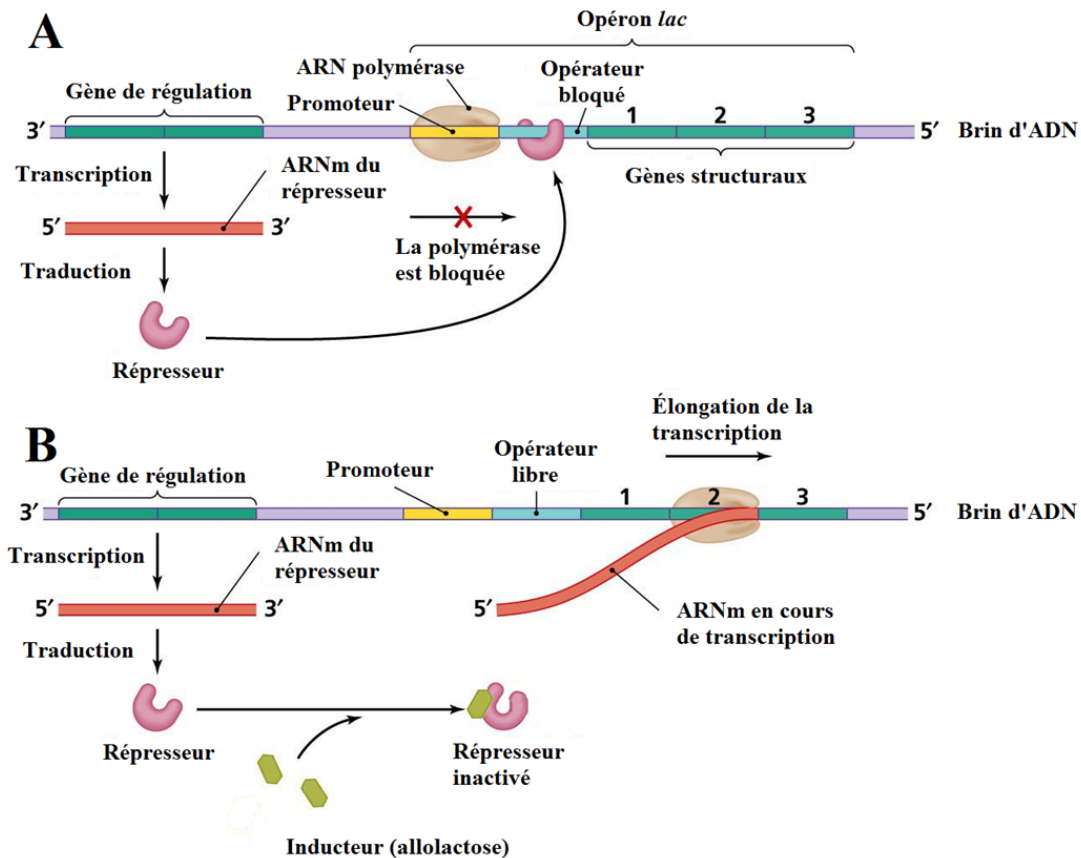


Figure 1.2. Régulation de l'expression de l'opéron lactose chez *E.coli* (A) En absence de lactose, un répresseur protéique empêche l'expression des gènes en amont de l'opéron par la liaison à l'opérateur, diminuant la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme du lactose. (B) En présence de lactose (et carence de glucose), un métabolite inducteur (allolactose) inactive le répresseur, ce qui permet la transcription des gènes de l'opéron par la polymérase (Figure adaptée de Campbell, 2007).

Il existe de nombreux autres exemples de contrôle de l'expression génétique par les protéines comme les facteurs de transcription, les activateurs protéiques, etc. L'ARN peut aussi jouer un rôle fonctionnel dans l'expression génétique comme dans le cas des petits ARN interférents (pARNi). Ils modulent l'expression génétique en se liant par complémentarité à l'ARNm. Par exemple, ils peuvent se lier sur le site d'initiation de la traduction, empêchant la reconnaissance de l'ARNm par les ribosomes, ce qui entraîne une

inhibition de la traduction (Vogel and Wagner, 2007). Les petits ARN interférents, qui ne codent pour aucune protéine, font partie d'une grande famille; les ARN non codants. L'élucidation du lien entre la structure et la fonction des ARN non codants a été le sujet de nombreuses études depuis leur découverte.

1.1.3 Importance de la structure de l'ARN : Exemple de l'ARNt

Ce n'est qu'en 1965 que le premier ARN non codant fut caractérisé : l'ARN de transfert (ARNt). Cet ARN constitue l'intermédiaire clé dans la traduction du message génétique en protéine par les ribosomes (Holley et al., 1965). L'ARNt permet le recrutement spécifique de chaque acide aminé au ribosome grâce à la reconnaissance spécifique de leur codon respectif. C'est grâce à des techniques puissantes, comme la cristallographie aux rayons X et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), qu'il a été possible de résoudre leur structure à l'échelle moléculaire. Cette découverte, qui a mérité un prix Nobel, a permis de démontrer que la structure de l'ARN peut lui conférer une fonction spécifique dans la cellule autre que celle d'être un messenger pour l'expression d'un ou plusieurs gènes, d'où vient le terme ARN « non codant ». La connaissance de la structure et du repliement d'un ARN permet d'obtenir de nombreux indices sur sa fonction et permettent d'orienter de nombreuses recherches.

La séquence nucléotidique des ARNt, aussi appelée structure primaire, est constituée des quatre mêmes nucléotides que les ARNm (guanine, cytosine, adénine et uracile), avec quelques exceptions concernant des bases modifiées (pseudouridine, dihydrouridine et certaines bases méthylées). Cette séquence nucléotidique s'organise majoritairement par appariement de paires de base complémentaires de type Watson-Crick canonique, caractéristique générale présente chez tous les types d'ARN. Cependant, il existe certaines exceptions permettant l'appariement de paires de base non canonique comme l'appariement bancal « wobble » et de certains acides nucléiques modifiés. Tous ces différents types d'appariements de paires de base sont particulièrement importants pour le repliement de

l'ARNt et permettent l'adoption d'une structure secondaire en forme de cruciforme, avec une tige hélicoïdale et trois-tige boucles (voir Fig 1.3B) (Goodenbour and Pan, 2006). La résolution de la structure tertiaire a été résolue grâce à la cristallographie aux rayons X (Sigler, 1975) (voir Fig. 1.3A). La deuxième tige-boucle, qui est en forme de L, contient l'anticodon et participe à la reconnaissance spécifique d'un codon présent sur l'ARNm afin que le ribosome puisse incorporer le bon acide aminé à la chaîne peptidique en cours de traduction (Kim et al., 1974).

La structure de l'ARNt est très importante pour sa fonction. Une simple mutation ponctuelle dans un nucléotide conservé peut grandement affecter sa fonction. Par exemple, une mutation d'un G en A à la position 4308 de l'ARNt^{Ile} (Isoleucine) mitochondrial chez l'humain peut grandement affecter sa structure en le comparant au type sauvage. Le G participe normalement à un appariement de paire de bases GC conservé dans la boucle T de l'ARNt^{Ile} chez les mammifères. La mutation empêche l'appariement de la paire de base conservée et perturbe la structure de l'ARNt, ce qui réduit l'efficacité de la maturation en 3' du précurseur de l'ARNt^{Ile}. Le manque d'ARNt^{Ile} mature dans les muscles cause l'ophtalmoplégie externe chronique progressive (CPEO) chez l'humain. Cet exemple démontre l'importance entre la structure et la fonction, car cette seule mutation empêche la formation de la boucle T de l'ARNt et stabilise une structure secondaire alternative menant à une maladie dégénérative (Schaller et al., 2011) (Abbott et al., 2014).

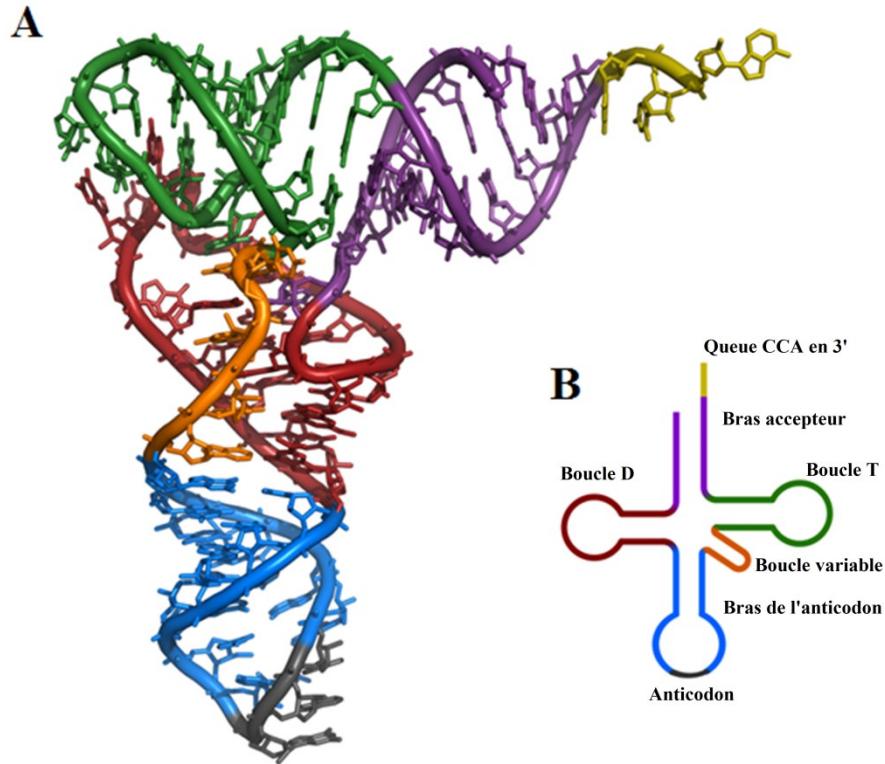


Figure 1.3. Représentation de la structure de l'ARNt. (A) Représentation de la structure tertiaire de l'ARNt. (B) Représentation de la structure secondaire de l'ARNt en forme de cruciforme. Chaque couleur représente une structure importante de l'ARNt, la queue CCA en jaune, le bras accepteur en mauve, la boucle variable en orange, la boucle D en rouge, la tige-boucle de l'anticodon en bleu et l'anticodon en noir et la boucle T en vert (Figure adaptée de Shi and Moore, 2000).

1.1.4 Importance de l'étude du repliement en temps réel d'un ARN : Exemple de la translocation de l'ARNt dans le ribosome

La translocation est un évènement important dans la traduction, impliquant de grands changements conformationnels dans le ribosome, le mouvement de deux ARNt ainsi que l'avancement de l'ARNm. Beaucoup de questionnements concernant le rôle spécifique du changement conformationnel de chaque composante restent sans réponse en ce qui concerne la translocation de l'ARNt durant la traduction. L'utilisation de techniques de

laboratoire utilisant la fluorescence, qui permet l'étude d'un ensemble de molécules ou à l'échelle de la molécule unique, permet de suivre des changements conformationnels dans le ribosome. Cependant, l'étude de l'ensemble du comportement structural de molécules ne donne que la valeur moyenne des changements conformationnels. Par conséquent, de l'information est perdue étant donné que cette technique ne permet pas d'avoir de l'information individuelle sur chaque molécule.

L'avantage de la technique à l'échelle de la molécule unique permet de suivre une seule molécule dans le temps, ce qui donne plus d'information sur la dynamique d'une population lorsqu'un bassin de molécules individuelles a été étudié. C'est pourquoi l'utilisation d'une technique permettant l'étude de molécules individuelle (échelle de la molécule unique) a permis la caractérisation du repliement en temps réel de l'ARNt dans le ribosome durant la translocation. Chez la bactérie, la petite sous-unité 30S du ribosome lie l'ARNm et l'extrémité contenant l'anticodon de l'ARNt. La grande sous-unité 50S interagit avec l'aminoacyl de l'ARNt situé sur son bras accepteur et catalyse la formation du lien peptidique. Après la formation du lien peptidique, les deux sous-unités du complexe ribosomal pivotent l'une par rapport à l'autre selon un mouvement brownien en présence de magnésium (voir Fig 1.4). Cette rotation permettrait aux ARNt de fluctuer entre deux états de conformation juste avant la translocation dans le ribosome. La première conformation est l'état de départ AA/PP (les anticodons sont dans le site A et P de la sous-unité 30S et les acides aminés accepteurs sont dans le site A et P de la grosse sous-unité 50S), et un état hybride AP/PE (les anticodons restent dans le site A et P de la sous-unité 30S et les bras accepteurs migrent vers le site P et E de la grosse sous-unité 50S) (voir Fig. 1.4). La formation du lien peptidique, en plus de la liaison du facteur EF-G, stabiliserait la conformation hybride AP/PE lors de la fluctuation entre les deux états (voir Fig. 1.4). L'étude à la molécule unique a permis de suivre la fluctuation de deux états conformationnels en temps réel (Blanchard et al., 2004). Aussi, une autre étude démontre qu'il existerait deux états hybrides différents et que les changements conformationnels globaux dans le ribosome induiraient ces fluctuations conformationnelles de l'ARNt

(Munro et al., 2007). Bref, ces exemples démontrent que l'étude du repliement de l'ARN en temps réel donne de l'information supplémentaire contre l'étude d'un ensemble de molécules (Tinoco et al., 2010) (Chen et al., 2012).

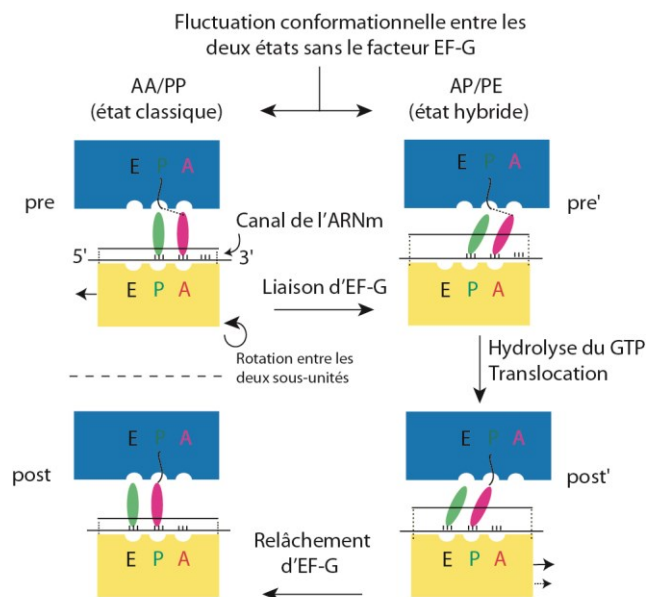


Figure 1.4. Mécanisme de translocation traductionnelle en 3 étapes. Deux ARNt sont respectivement dans les positions AA/PP entre la petite sous-unité du ribosome 30S (en jaune) et la grande sous-unité 50 S (en bleu); l'ARNt violet est dans la position AA (anticodon et bras accepteur d'acides aminés où la chaîne peptidique est attachée) et l'ARNt vert est PP (d'où vient le terme de position AA/PP pour les deux ARNt). Dans la deuxième étape, la rotation de l'ARNr 30S par rapport à l'ARNr 50 S et entraîne une fluctuation conformationnelle des deux ARNt entre l'état classique et un état hybride. La liaison du facteur EF-G stabilise la conformation hybride. L'hydrolyse du GTP par EF-G entraîne un changement de position AP/PE des deux ARNt translocant l'ARNm et les deux ARNt. Le relâchement du facteur EF-G entraîne une rotation inverse des deux sous-unités du ribosome et entraîne un changement de conformation des deux ARNt sans changer leurs positions (Figure adaptée de Frank and Agrawal, 2000) (Frank, 2012).

1.1.5 Importance du repliement d'un ARN en cours de transcription : Exemple de la ribonucléase P

Il existe de nombreux autres exemples d'ARN dont la structure confère une fonction spécifique. Par exemple, la ribonucléase P (RNase P) catalyse la maturation des ARNt par un clivage endonucléolytique à un site spécifique grâce à sa composante d'ARN. Sa structure d'ARN est composée de deux domaines indépendamment repliés: un domaine catalytique et un domaine spécifique. Le domaine catalytique reconnaît le bras accepteur et la région CAA en 3' du précurseur de l'ARNt et catalyse son hydrolyse en 5', définissant la RNase P comme étant un ribozyme. Le domaine de spécificité S est impliqué dans la reconnaissance spécifique d'un site du substrat par l'interaction avec la tige T ψ C et la boucle D du précurseur de l'ARNt. (Kazantsev et al., 2005). Des équipes de recherche ont testé le changement de la vitesse d'élongation de la transcription et l'ajout de facteurs induisant des pauses de la polymérase afin de comprendre ce qui est important pour le repliement co-transcriptionnel des domaines de la RNase P. L'augmentation de la vitesse d'élongation de la transcription peut se faire grâce à l'utilisation de la polymérase du phage T7 qui est plus rapide que la polymérase native d'*E. coli*. La diminution de la concentration de rNTP permet de ralentir la transcription. Les différents essais transcriptionnels ont démontré que la modification de la vitesse de la transcription de la composante ARN circulairement permuté de la RNase P à elle seule ne modifie pas son mécanisme et son taux de repliement en absence de facteurs de transcription. Par contre, le mécanisme de repliement a changé drastiquement lors de l'ajout du facteur d'élongation NusA, qui joue un rôle dans la terminaison de la transcription et la durée des sites de pauses. En présence de NusA, le repliement du domaine de spécificité se fait au moins 3 fois plus vite que le domaine catalytique, ce qui permet un repliement plus rapide de l'ARN. À l'opposé, en absence de NusA, le domaine catalytique se replie plus vite que le domaine de spécificité, ce qui mène à un mauvais repliement (voir Fig 1.5). L'augmentation du temps de pause de l'ARN polymérase durant la transcription permettrait au domaine de spécificité de se replier correctement, ce qui amène à un ARN fonctionnel.

Bref, l'étude du repliement co-transcriptionnel peut donner des informations sur la manière dont un ARN se replie dans un contexte cellulaire pour en arriver à la formation de structures fonctionnelles, notamment pour les complexes ARN-protéine incluant la RNase P (Pan and Sosnick, 2006).

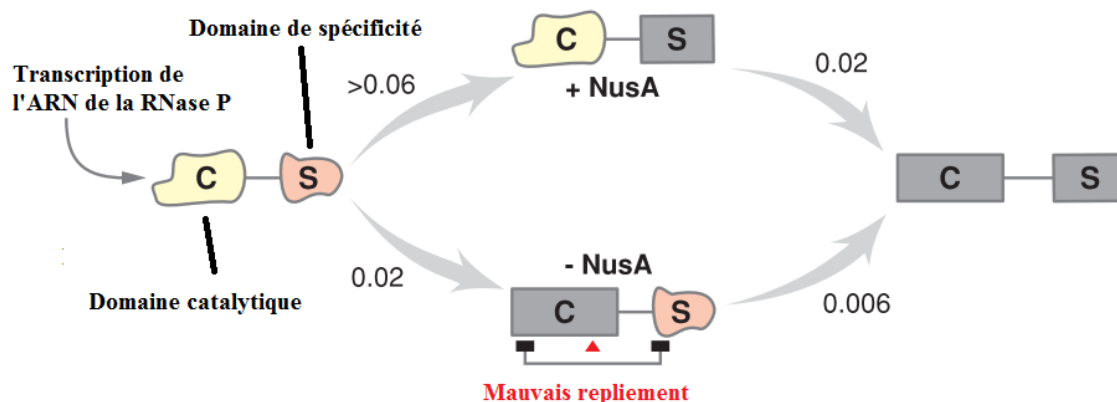


Figure 1.5. Schéma du repliement de l'ARN circulairement permuté de la RNase P en présence/absence du facteur d'élongation NusA durant la transcription. Les taux de repliement de la RNase P sont montrés au-dessus des flèches (en secondes). Avec la présence de NusA, qui augmente le temps de pause de l'ARN polymérase, l'ARN se replie dans un état intermédiaire constitué par un domaine spécifique correctement replié (en gris foncé) et un domaine catalytique non replié contrairement à l'essai sans NusA (Figure adaptée de Pan and Sosnick, 2006).

Les RNases P servent de paradigme pour comprendre la structure et l'architecture de différents ARN similaires, la nature catalytique des ribozymes, la reconnaissance structurale d'ARN en *trans* ainsi que l'évolution d'enzymes archaïques constitués seulement d'ARN jusqu'aux enzymes protéiques modernes. Dans tous ces exemples, la compréhension de la structure de l'ARN peut être le premier pas vers la compréhension de la fonction de nombreux mécanismes moléculaires essentiels dans la cellule. Le sujet de ce mémoire porte sur l'étude de la structure d'une catégorie d'acide nucléique particulière, les riborégulateurs, afin de pouvoir mieux comprendre sa fonction et ses applications. Le

changement de structure des riborégulateurs fait un lien direct avec une fonction essentielle dans la cellule, qui est le changement de l'expression génétique.

1.2 Les riborégulateurs

1.2.1 Caractéristiques générales des riborégulateurs

Les riborégulateurs sont des éléments structuraux se situant dans la partie 5' non-codante (UTR) des ARNm (Serganov and Nudler, 2013). Ils sont généralement retrouvés chez la bactérie, mais quelques exceptions se retrouvent chez les plantes (Kubodera et al., 2003) et les champignons (Cheah et al., 2007). La structure du riborégulateur est constituée de deux domaines interreliés, l'aptamère et la plateforme d'expression (voir Fig. 1.6). L'aptamère possède la capacité de reconnaître spécifiquement un ligand qui est généralement un métabolite cellulaire impliqué dans la voie métabolique des gènes de l'ARNm dans lequel il est situé. Plusieurs gènes régulés par les riborégulateurs sont impliqués dans le transport ou la biosynthèse/dégradation de leur ligand, constituant une boucle de régulation par rétroactivation.

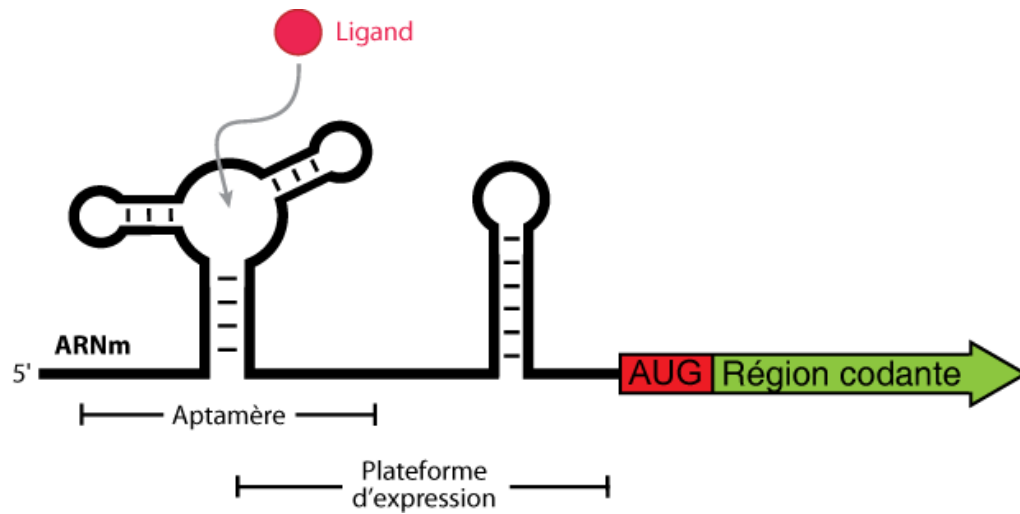


Figure 1.6. Représentation générale d'un ARNm contenant un riborégulateur. Le riborégulateur, se retrouvant dans le 5' non-traduit (5' UTR) de l'ARNm, comprend deux domaines. L'aptamère est la structure ayant la capacité de lier de manière spécifique un ligand et la plateforme d'expression est le domaine qui permet la régulation génétique (Figure adaptée de Roth et Breaker (2009)).

Jusqu'à maintenant, plus de 25 familles différentes de riborégulateurs ont été identifiées et validées, liant une panoplie d'effecteurs comme des acides aminés et dérivés [lysine, glycine, S-adenosylméthionine (SAM), S-adenosylhomocystéine (SAH), glutamine], des acides nucléiques et dérivés [Adénine, guanine, c-di-GMP, pré-Queuosine (preQ1)], des ions métalliques [magnésium, fluor, manganèse, cobalt et nickel], des cofacteurs [flavine mononucléotide (FMN), thiamine pyrophosphate (TPP), cofacteur à molybdène (MoCo), adénosylcobalamine (AdoCbl), aquacobalamine (Aqco), etc.]. Ils répondent également à des paramètres physico-chimiques [température (Morita et al., 1999) et pH (Nechooshtan et al., 2009)] (Barrick and Breaker, 2007). Le riborégulateur *glmS* peut lier la glucosamine-6-phosphate et certains sucres ayant une structure similaire (Watson and Fedor, 2011). Certains motifs d'ARN sont appelés orphelins, car la nature de leur ligand est toujours méconnue jusqu'à maintenant [*ykkC*, *yybP*, *yjdF*, *susA*]. Le criblage de séquences dans des bases de données génomiques et l'analyse comparative de ces séquences ont permis

d'identifier ces potentiels motifs. Les motifs orphelins sont phylogénétiquement répandus dans différentes bactéries et possèdent un aptamère conservé interagissant avec des structures permettant la régulation génétique comme des séquestreurs du site de liaison du ribosome et des terminateurs de transcription (Meyer et al., 2011). Il existe également différents aptamères, possédant tous des séquences et structures différentes ayant la capacité de lier la même molécule, comme dans le cas de S-adénosylméthionine. Jusqu'à ce jour, cinq classes de riborégulateurs SAM ont été confirmées (voir Tableau 1.1)(Tausch et al., 2014). C'est également le cas du riborégulateur pré-Queuosine qui possède 3 classes (McCown et al., 2014), des riborégulateurs magnésium (Ramesh and Winkler, 2010) et c-di-GMP (Sudarsan et al., 2008), qui possèdent chacun deux classes.

L'interaction des acides nucléiques des aptamères avec les groupements chimiques de leur ligand permet à chaque riborégulateur d'avoir une grande affinité et spécificité pour la reconnaissance moléculaire. Ces régions, où il y'a des interactions, sont très conservées et confèrent une structure tridimensionnelle sophistiquée pouvant impliquer des appariements de paires de base formant des tiges boucles, des pseudonoeuds et différentes interactions tertiaires. Suite à la liaison du ligand, l'aptamère communique avec la plateforme d'expression par un changement conformationnel qui à son tour permet de moduler l'expression des gènes en aval de l'ARNm. Ce changement structural peut inhiber ou activer l'expression des gènes via de nombreux mécanismes propres à chacun.

1.2.2 Le contrôle de l'expression génétique par les riborégulateurs

En plus de l'abondance de différents ligands pouvant lier leur riborégulateur respectif, il existe de nombreux mécanismes de régulation génétique tels la terminaison prématurée de la transcription, l'inhibition de l'initiation de la traduction (Serganov and Nudler, 2013), la régulation *in trans* par des petits ARN (Loh et al., 2009), le contrôle de la dégradation de l'ARNm (Caron et al., 2012) et l'épissage alternatif (Cheah et al., 2007) (Wachter et al., 2007), ce dernier étant le seul mécanisme découvert chez les eucaryotes. Ce mémoire se

concentre sur les riborégulateurs bactériens. Ces mécanismes de régulation sont basés sur la formation de structures d'ARN mutuellement exclusives qui sont dépendantes de la liaison du ligand.

1.2.2.1 La terminaison Rho-indépendante

Concernant la terminaison prématurée de la transcription, elle peut se faire de façon Rho-indépendante. Ce type de régulation transcriptionnelle est aussi appelé terminaison intrinsèque et implique la formation d'une tige terminatrice (tige-boucle) (voir Fig. 1.7A). Cette tige est caractérisée par une région riche en guanine et cytosine (GC) en plus d'être suivie par une extrémité d'approximativement 8 uraciles (poly-U) (Farnham and Platt, 1981). Cette tige, retrouvée fréquemment en aval d'un promoteur ou entre certains gènes d'un opéron, joue un rôle important dans la régulation génétique chez la bactérie.

Dans le cas des riborégulateurs, une tige-boucle anti-terminatrice séquestre la tige terminatrice en absence du ligand. La tige terminatrice, se formant après la liaison au ligand, inactive et déstabilise le complexe d'élongation de l'ARN polymérase (voir Fig. 1.7A). La polymérase finit par se décrocher de l'ADN, laissant un ARN non fonctionnel destiné à se faire dégrader. Le contrôle de la terminaison de la transcription implique la capacité de la cellule à dicter si un terminateur va bloquer la transcription ou sera ignoré par la polymérase, ce qui a amené à deux modèles mécanistiques qui ont été proposés pour expliquer ce type de terminaison de la transcription. Le modèle « cinétique de compétition » suggérerait que la polymérase effectue une pause au site où le terminateur se situe, augmentant la probabilité que le complexe d'élongation se dissocie de l'ADN. Le relâchement de l'ARN se ferait spontanément suite à la déstabilisation de l'hybride ARN-ADN causé par la tige-boucle. Le modèle « allostérique » suggérerait que la tige-boucle terminatrice déstabiliserait l'interaction entre l'ARN et la polymérase, soit à la sortie de l'ARN (en 5') ou à l'entrée des nucléotides (en 3'). Si la déstabilisation se fait en 3', il y a

rejet du reste de l'ARN en cours de transcription dû à cet état conformationnel transitoire causé par la tige terminatrice (Gusarov and Nudler, 1999) (Friedman and Court, 1995).

1.2.2.2 La terminaison Rho-dépendante

En plus de la terminaison transcriptionnelle Rho-indépendante, la bactérie utilise un deuxième mécanisme, la terminaison Rho-dépendante. Le facteur Rho est une protéine se liant sur une séquence nucléotidique spécifique d'un ARN en cours de transcription appelée *Rut* (site d'utilisation de Rho). Ces sites, qui sont généralement 80 nucléotides non conservés de long, sont riches en cytosines et possèdent peu de structures secondaires. Suite à sa liaison, la protéine hydrolyse l'ATP pour y enfiler l'ARN naissant à travers la cavité centrale de la structure de son anneau. Lorsque le transcrit naissant a passé à travers l'anneau de la protéine, Rho se dirige dans la direction 5' vers 3' pour rattraper l'ARN polymérase et favoriser la dissociation de l'ARN polymérase qui est généralement en arrêt de transcription (site de pause) (Proshkin et al., 2014).

Lorsque la concentration de ligand est au niveau du seuil de liaison, le riborégulateur adopte une conformation qui favorise la liaison de Rho provoquant une terminaison prématurée de la transcription, comme dans le cas du riborégulateur répondant au magnésium *mgtA* (voir Fig. 1.7B) (Hollands et al., 2012). Une équipe de recherche (Proshkin et al., 2014) a utilisé un inhibiteur (bicyclomycine) de la protéine Rho dans un essai transcriptionnel pour prouver que la terminaison de la transcription était causée par Rho et non par une tige terminatrice Rho-indépendante. L'ajout de bicyclomycine a empêché la terminaison de la transcription par Rho, ce qui permet à la polymérase de continuer la transcription de *mgtA* en amont du riborégulateur liant le magnésium (voir Fig. 1.7C). Lorsque la concentration de ligand est sous le seuil de liaison, le riborégulateur adopte une conformation qui prévient Rho de se lier sur l'ARN naissant ce qui permet au ribosome de se lier et effectuer la traduction. Bref, ce mécanisme de régulation au niveau de la transcription serait probablement répandu étant donné qu'il n'y a pas beaucoup de

tiges terminatrices Rho-indépendantes dans la séquence de la plateforme d'expression de la plupart des riborégulateurs (Proshkin et al., 2014).

1.2.2.3 Mécanisme de régulation traductionnelle

Dans le cas de l'inhibition de la traduction chez les riborégulateurs, il y'a formation d'une tige-boucle dans la plateforme d'expression suite à la liaison du ligand (voir Fig. 1.7D). Ce changement conformationnel de la plateforme d'expression participe à la séquestration du site de liaison du ribosome (RBS), aussi appelée séquence de Shine-Dalgarno (SD). Par conséquent, le ribosome ne peut pas reconnaître le site d'initiation de la traduction de l'ARN naissant, ce qui cause une répression de l'expression génétique au niveau de la traduction protéique du/des gènes en amont du riborégulateur (Fuchs et al., 2006). L'absence de ribosome sur un ARNm peut fortement modifier sa stabilité, car un ARNm nu a beaucoup plus de chance de se faire dégrader par différents facteurs. Dans le cas d'une traduction fonctionnelle, de nombreux sites de clivages, qui sont situés dans son cadre de lecture ouvert (ORF), sont normalement cachés par les polysomes. Par contre, l'augmentation de l'accessibilité des sites de clivages d'un ARN nu augmente la probabilité des attaques par des ribonucléases (Caron et al., 2012). Cependant, la dégradation d'un ARNm (dans le cas de l'inhibition de la traduction) peut aussi être indépendante d'attaques nucléophiles enzymatiques. Ce mécanisme joue un rôle dans le contrôle de la qualité des ARNm par la suppression des complexes transcriptionnels non fonctionnels et aussi dans certains cas où le ribosome est arrêté anormalement en cours de traduction (Deana and Belasco, 2005).

plateforme d'expression, permettant la transcription des gènes en aval. Liée au ligand, une tige terminatrice se forme et fait décrocher la polymérase, inhibant l'expression des gènes par terminaison de la transcription.

(B et C) Représentation du mécanisme de la terminaison Rho-dépendante d'un complexe transcriptionnel impliquant un riborégulateur. (B) Lié au ligand, la protéine Rho est recrutée et fait décrocher la polymérase par son activité ATPase, inhibant l'expression des gènes par terminaison de la transcription.. (C) Sans ligand, une structure alternative du riborégulateur prévient le recrutement de la protéine Rho, ce qui permet la transcription et la traduction des gènes en amont.

(D) Représentation du mécanisme d'inhibition de la traduction impliquant un riborégulateur. En absence de ligand, le site de liaison du ribosome (RBS) est accessible, ce qui permet le recrutement des ribosomes favorisant la traduction des gènes de l'ARNm. En présence de ligand, le RBS est séquestré dans une tige boucle, empêchant la liaison des ribosomes ce qui inhibe la traduction (Figure adaptée de Proshkin et al. 2014).

1.3 Le riborégulateur SAM-I

1.3.1 S-adénosylméthionine et S-adénosylhomocystéine

Le S-Adénosylméthionine (AdoMet ou SAM) est un métabolite important et présent chez tous les organismes vivants. Il est synthétisé à partir de la méthionine et de l'ATP par l'enzyme SAM synthétase. Son rôle dans la cellule est essentiel, car son groupement méthyl donneur participe à de nombreuses réactions biochimiques dans la cellule. Ce méthyl, attaché sur le groupement ionique sulfonium de SAM, est très labile et peut être transféré facilement à d'autres substrats accepteurs par de nombreuses méthyltransférases. (voir Fig. 1.8A) (Montange and Batey, 2006) SAM est converti en SAH suite à l'élimination du méthyl, transformant le sulfonium en sulfure de carbone (voir Fig. 1.8B). Le riborégulateur SAM-I est le tout premier motif de riborégulateur SAM découvert (Grundy and Henkin, 1998). Il existerait plus de 3 superfamilles d'aptamères liant

spécifiquement le SAM possédant tous une structure différente (voir Tableau 1.1) : la superfamille SAM-I (comprenant SAM-I [S-box], SAM-IV et la famille SAM-I/IV), la superfamille SAM-II (comprent SAM-II et SAM-V) et la superfamille (SAM-III [ou SMK-box]) (Grundy and Henkin, 1998).

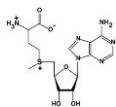
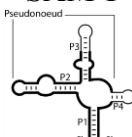
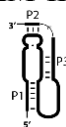
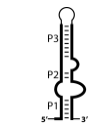
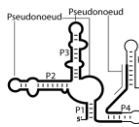

Riborégulateur / ligand	Exemples de gènes contrôlés	Ligand Fonctions biologiques	Structure secondaire de l'aptamère
<i>S</i> -adénosyl- méthionine (SAM) <i>S</i> -box	Métabolisme du soufre. Biosynthèse de la cystéine. Biosynthèse et recyclage de la méthionine. Biosynthèse de la SAM. Réductase de méthylène tétrahydrofolate.	 Dérivé de la méthionine. Réactions de méthylation (ADN, ARN, protéines).	<div> <div>SAM-I</div>  </div> <div> <div>SAM-II</div>  </div> <div> <div>SAM-III</div>  </div> <div> <div>SAM-IV</div>  </div> <div> <div>SAM-V</div>  </div>

Tableau 1.1 : Familles des riborégulateurs liant SAM. Certaines voies métaboliques impliquées dans le métabolisme du soufre et de certains acides aminés sont contrôlées par le riborégulateur SAM. La molécule SAM, qui est la deuxième molécule la plus produite dans une cellule juste après l'ATP, occupe différentes fonctions biologiques essentielles. Les structures secondaires des cinq différentes familles de riborégulateurs découvertes jusqu'à présent sont montrées dans le tableau. Référence : Grundy et Henkin, 2004, Heppell et Lafontaine, 2008, Nudler et Mironov, 2004, Roje, 2006, Winkler et Breaker, 2005

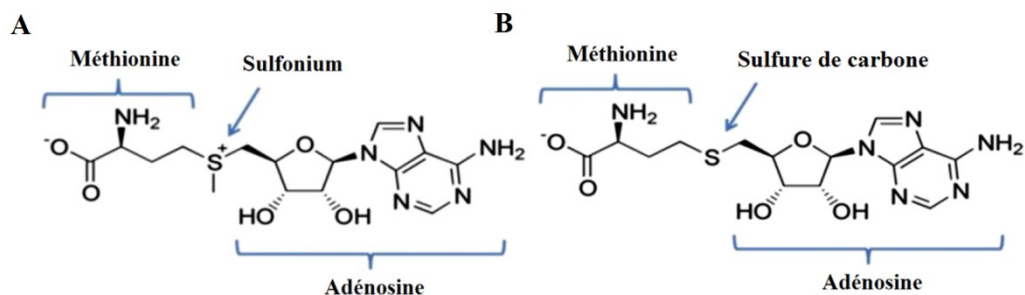


Figure 1.8. Représentation de SAM et SAH. (A) S-Adénosylméthionine (SAM). Les trois parties de SAM qui interagissent avec l'aptamère du riborégulateur SAM sont les groupements adénosine, l'ion sulfonium chargé positivement et la queue méthionine. Le méthyl labile situé sur le groupement sulfonium sert de substrat à de nombreuses réactions de méthylations dans la cellule. (B) S-Adénosylhomocystéine (SAH). SAM est converti en SAH suite à l'enlèvement du méthyl, transformant le sulfonium en sulfure de carbone.

1.3.2 Découverte du riborégulateur SAM-I (S-box)

Le riborégulateur SAM-I (S-box) de *B. subtilis* est le premier de sa catégorie à avoir été découvert et le plus étudié parmi tous les autres riborégulateurs pouvant lier le SAM. En 1998, les équipes de Grundy et Henkin ont observé au moins 11 unités de transcriptions situées dans le 5' UTR de gènes impliqués dans la synthèse de la méthionine et de la cystéine chez *B. subtilis*. Ces unités structurales possèdent une tige terminatrice de transcription qui entre en compétition avec un anti-terminateur et un élément conservé (S-box) impliqué dans la terminaison de la transcription. Le terme riborégulateur n'existait pas à cette époque; c'est pourquoi le terme S-box a été utilisé. L'équipe a également démontré que cette S-Box servait de cible pour répression de gènes impliqués dans le métabolisme du soufre lorsque la bactérie poussait dans un milieu riche en méthionine (Grundy and Henkin, 1998). Ce n'est que 5 ans plus tard qu'il fut appelé riborégulateur et que son mécanisme de régulation génétique impliquant la liaison de la molécule SAM fut caractérisé (Epshtein et al., 2003). Ce type de riborégulateur est largement répandu chez les bactéries Gram-positives. Plusieurs isoformes de SAM-I peuvent être présentes chez une même bactérie, à

laquelle chacune d'entre elles peuvent répondre à une concentration différente de ligand, comme *B. subtilis* (Price et al., 2014).

1.3.3 Contrôle de l'expression génétique par SAM-I

La grande majorité des riborégulateurs SAM-I semblent fonctionner via un mécanisme de régulation transcriptionnelle, car ils possèdent une tige boucle terminatrice suivie par une tige poly-U (terminaison Rho-indépendante). Suite à la liaison du ligand SAM, il y aurait formation de la tige P1, entraînant la formation de cette tige terminatrice dans la plateforme d'expression modifiant négativement l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du soufre.

Cependant, il existe un riborégulateur SAM-I chez *L. monocytogenes* possédant un mécanisme de régulation génétique unique agissant en *trans* (Loh et al., 2009). En effet, la terminaison de la transcription par le riborégulateur SAM-I entraîne la production d'aptamères libres (SreA et SreB) sous forme de transcrits abortifs. Ces petits ARN régulateurs provenant du riborégulateur *SreA* et *SreB* inhibent l'expression génétique du facteur de virulence PrfA par la liaison par appariement de paire de base sur la région non codante en 5' de son ARNm. Cette découverte met en évidence le rôle d'un riborégulateur utilisant un mécanisme particulier impliqué dans la virulence bactérienne (Loh et al., 2009).

1.3.4 Détails de la structure de l'aptamère du riborégulateur SAM-I

La structure du riborégulateur SAM-I est constituée d'un aptamère conservé et d'une plateforme d'expression non conservée (Montange and Batey, 2006). En ce qui concerne l'aptamère, une équipe de recherche a résolu la structure liée au ligand SAM du cristal de l'aptamère du riborégulateur SAM-I de *T. tengcongensis* en 2006 (voir Fig. 1.9B). La structure de l'aptamère est constituée d'une jonction de 4 voies (tige P1 à P4), dont deux ensembles d'empilements hélicoïdaux coaxiaux (P1 avec P4 et P2 avec P3) (voir Fig.

1.9A). Il y a également une structure en forme de coude, aussi appelée motif K, faisant pencher la tige P2 d'environ 100°. Ce motif est situé entre la région P2a et P2b de la tige P2. La région L2 de la tige P2b participe à la formation d'un pseudonoeud interagissant avec des paires de base du cœur dans la jonction de la tige P3 et P4 (J3/4). Ce pseudonoeud, se formant suite à la liaison du magnésium, participe également à la préorganisation du site de liaison du ligand, aussi appelée F_{Mg} ou état intermédiaire. Il y a une paire de base importante et conservée dans le cœur de l'aptamère participant à l'empilement hélicoïdal de la tige P1 et P4 (Montange and Batey, 2006).

L'aptamère du riborégulateur SAM-I, comme les riborégulateurs de purines, possède une structure architecturale globale préétablie suite à la liaison d'ions métallique comme le magnésium. Les motifs structuraux situés en dehors du cœur de l'aptamère, comme le pseudonoeud de la tige P2 par exemple, facilitent son repliement et sa liaison au ligand. S-Adénosylméthionine est lié à l'intérieur d'une poche de liaison dans le cœur de l'aptamère qui est situé entre les tiges P1 et P3 et la jonction 1/2. À l'intérieur de cette poche de liaison, le ligand SAM adopte une conformation dans laquelle le groupement méthionine s'empile sur son noyau d'adénine. Cette conformation est différente de celle présente en interaction avec les protéines (en *trans*) sauf quelques exceptions comme les méthyltransférases et le répresseur MetJ. Le noyau adénine de SAM est la base d'une interaction triple entre une adénine et un uracile présent dans la tige P3. Ces deux nucléotides font partie d'une boucle interne asymétrique dans l'hélice P3 et semblent être conservés parmi tous les riborégulateurs SAM-I (Montange and Batey, 2006).

L'aptamère du riborégulateur SAM-I contient également des régions non conservées. En effet, la longueur de la tige P3 varie considérablement. Elle peut contenir entre 10 et 50 paires de base. Certaines tiges P3 contiennent une section cruciforme au sommet de la tige P3, dont le rôle n'a pas été encore déterminé (Grundy and Henkin, 1998). De plus, la longueur de la tige P4 possède différentes longueurs entre les variants de SAM-I et 6% des aptamères SAM ne contiennent pas de tige P4. (Weinberg et al., 2008) Le variant *fn02* de la

bactérie *F. nucleatum* est un exemple d'un variant naturel SAM-I qui ne contient pas de tige P4 (Heppell et al., 2011). Ce variant lie la SAM avec une affinité plus faible (K_d de ~ 100 nM) (données non publiées) que le variant *yitJ* de 4 voies (K_d de 4 nM). SAM-I peut également lier son analogue, le SAH, avec une affinité 550 fois plus faible que le SAM (Montange et al., 2010). Les autres aptamères des autres familles ont une affinité plus faible que le SAM-I. Le SAM-II de *A. tumefaciens* possède un K_d de ~ 10 μ M, le *metX* SAM-II un K_d de 140 à 200 nM et le SAM-III un K_d de 400-500 nM. La diversité des aptamères liant le SAM permet aux cellules de pouvoir activer/désactiver les voies métaboliques du soufre et de la méthionine selon différents gradients de concentration de SAM étant donné que ces aptamères contrôlent différents gènes. La diversification de ces riborégulateurs pourrait être une explication sur l'évolution de mécanismes de régulation génétique ciblant la même molécule étant donné que l'ARN possède une grande possibilité d'architecture structurale permettant de détecter une molécule spécifiquement.

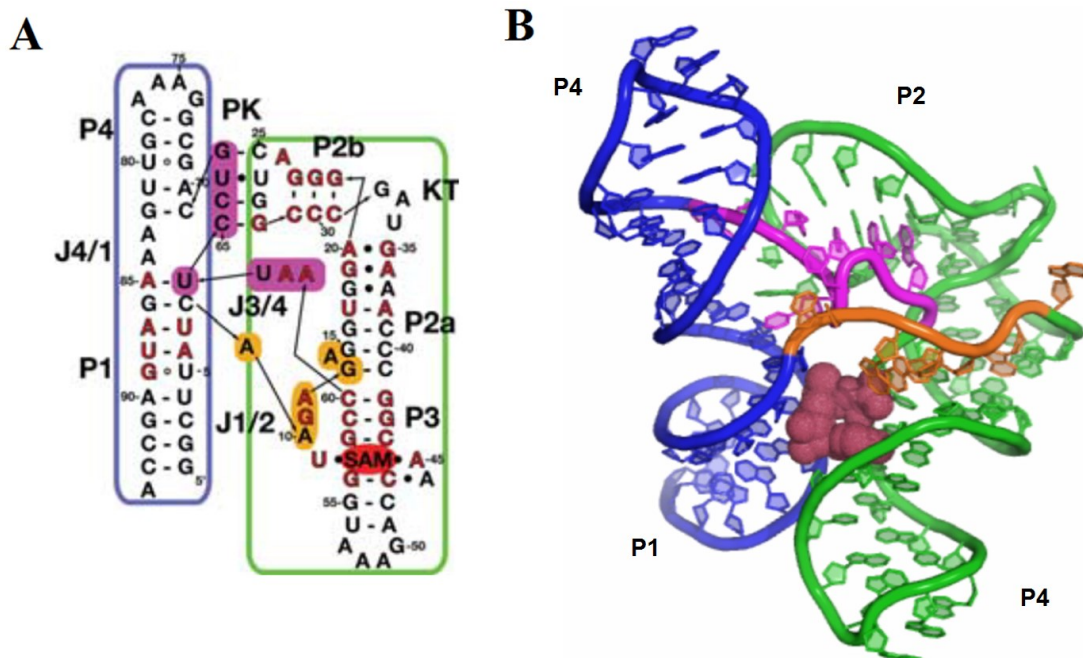


Figure 1.9. Structure secondaire et tertiaire du riborégulateur SAM-I. (A) Structure secondaire de l'aptamère du riborégulateur SAM-I reflétant l'organisation de sa structure tertiaire; les nucléotides qui sont conservés à plus de 95% sont en rouge. Les flèches noires représentent le squelette de phosphate de l'ARN. PK veut dire pseudonoeud et KT veut dire motif K. (B) Représentation tridimensionnelle de la structure tertiaire de l'aptamère du riborégulateur SAM-I. Le SAM est en rouge à l'intérieur du cœur. La tige P1 et P4 sont en bleus et la tige P2 et P3 sont en vert. La jonction 1/2 est en orange (Figure tirée de Montange et Batey, 2006).

1.3.5 Mécanisme de repliement de l'aptamère du riborégulateur SAM-I en deux étapes

L'aptamère de SAM-I possède un mécanisme de repliement qui se produit en deux étapes (voir Fig 1.10). (Heppell et al., 2011) La première étape est dépendante du magnésium et la deuxième est stabilisée par la liaison de SAM. La liaison du magnésium permet la préorganisation du site de liaison du ligand (aussi appelé état intermédiaire ou F_{Mg}). Elle est caractérisée principalement par la formation du motif K et du pseudo-noeud, qui sont des

structures essentielles au repliement de l'aptamère. Une mutation G55C/G56C, bloquant la formation du pseudonoeud, empêche l'état F_{Mg} de se former. Cette mutation empêche conséquemment la liaison du ligand étant donné qu'elle déstabilise drastiquement la structure de l'aptamère. De plus, il y a un empilement hélicoïdal de la tige P2 et P3 qui se forme suite à la liaison du magnésium, rapprochant la tige P1 et P3. Suite à l'adoption de cette conformation qui est favorable à la liaison du ligand, la liaison de SAM stabilise la formation de l'état natif F_{NS} . Le F_{NS} est caractérisé par l'empilement des tiges P1 et P4 et de la rotation de la tige P1. Le terme « natif » a été utilisé à l'instar du terme « lié au ligand » étant donné que l'état F_{NS} a été observé par sm-FRET en présence de magnésium sans ligand (voir section 1.4 pour les détails concernant le sm-FRET). Plus précisément, c'est la rotation de la tige P1 qui a été observée en présence de magnésium et l'addition de SAM stabilise la conformation dans laquelle la P1 a tourné. Il faut noter que la structure du F_{NS} en absence de ligand n'est probablement pas structuralement identique à l'état replié lié au ligand comme la structure cristalline le démontre.

La théorie de capture conformationnelle pourrait expliquer la formation d'une structure ressemblant au F_{NS} en l'absence du ligand. Cette théorie impliquerait une oscillation entre trois états conformationnels, et le ligand se lierait sur une des conformations, qui serait le F_{NS} dans le cas de l'aptamère SAM-I (voir Fig. 1.11) (Hammond, 2011). Cette théorie pourrait être intéressante à étudier à l'aide d'une approche permettant l'analyse du comportement de molécules de manière individuelle. Par exemple, la technique de sm-FRET permettrait la détection de changements conformationnels en temps réel à chaque étape avec l'utilisation d'aptamères contenant des fluorophores à différents endroits stratégiques. Aussi, l'utilisation de divers mutants permettrait de bloquer la formation d'états conformationnels et donnerait une idée de ce qui est important pour le repliement de l'aptamère. Le sm-FRET constitue une technique de choix pour étudier des conformations intermédiaires comme le F_{Mg} de l'aptamère SAM-I.

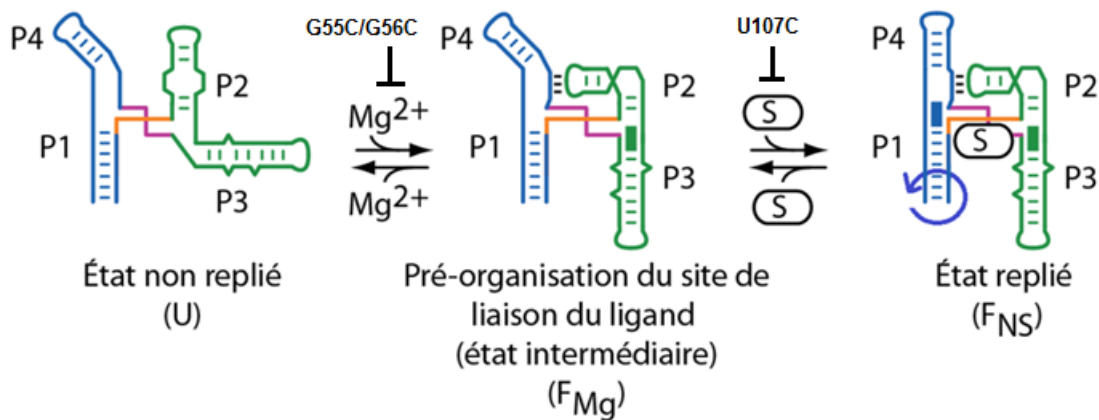


Figure 1.10. Mécanisme de repliement de l'aptamère du riborégulateur SAM-I. Un changement conformationnel s'effectue lors de la liaison du magnésium, faisant passer l'aptamère d'un état non replié (U) vers un état intermédiaire (F_{Mg}). Cet état est caractérisé par la formation du motif K de la tige P2, du pseudonœud entre la boucle L2 de la P2a et la jonction 3/4, de l'empilement hélicoïdal de la P2 et P3 et de la juxtaposition de la P1 et P3. La liaison du SAM stabilise la formation de l'état replié (F_{NS}), qui est caractérisé par l'empilement hélicoïdal entre la tige P1 et P4 et la rotation de la tige P1 (Figure adaptée de Heppell et al., 2011).

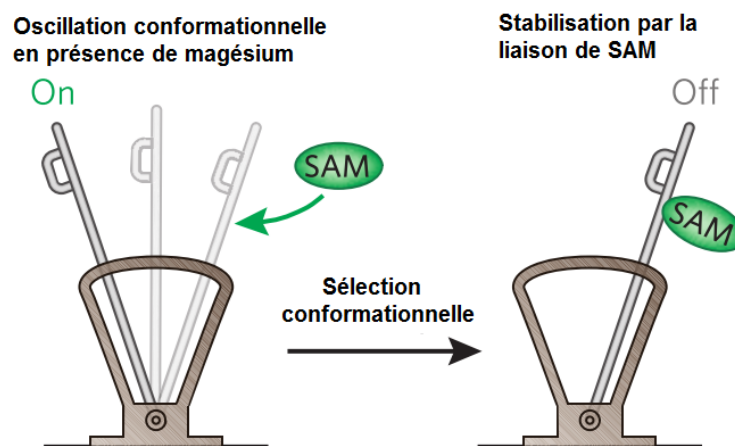


Figure 1.11. : Changements conformationnels de SAM-I entre 3 états ($F_U \rightarrow F_{Mg} \rightarrow F_{NS}$) en présence de magnésium. Sélection conformationnelle et stabilisation de F_{NS} en présence de SAM (Figure adaptée de Hammond, 2011).

1.4 Étude du mécanisme de repliement de l'aptamère du riborégulateur SAM-I à l'échelle de la molécule unique

1.4.1 Principes du transfert d'énergie par résonance de type Förster

Durant la dernière décennie, l'application de techniques utilisant le principe de transfert d'énergie de type Förster à l'échelle de la molécule unique (sm-FRET) a permis de donner des détails sur les changements conformationnels de molécules individuelles en temps réel. De nombreux phénomènes biologiques ont pu être appliqués au sm-FRET comme le repliement de l'ARN (ribozyme et riborégulateurs) et de l'ADN (jonction Holliday), l'activité hélicase à ADN et ARN, la transcription, etc. (Hwang et al., 2009).

Le sm-FRET utilise la fluorescence, qui est un phénomène physique dans lequel un fluorophore émet un photon en réponse d'une excitation par une lumière ayant une longueur d'onde spécifique. En effet, lorsque le fluorophore absorbe un photon, un de ses électrons passe à une couche électronique supérieure et devient excité. L'électron peut relâcher son énergie de nombreuses manières, soit en émettant un photon ou en transférant son énergie à un autre fluorophore compatible par un mécanisme appelé transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET). Ce transfert d'énergie non radiatif est issu d'une interaction dipôle-dipôle entre les deux fluorophores et est étroitement lié avec la distance (voir Fig. 1.12). Dans un essai de FRET, la molécule étudiée est marquée chimiquement avec une paire de fluorophores compatibles, comme le fluorophore donneur Cyanine 3 (Cy3) et le fluorophore accepteur Cyanine 5 (Cy5). Ces deux fluorophores, en plus de la fluorescéine, sont couramment utilisés pour les expériences de FRET à cause de leur efficacité élevée (voir Tableau 1.2). Ils ont un coefficient absorption molaire élevé, qui est un critère de choix pour la sélection de fluorophores. Le rendement quantique est un facteur à considérer également, car il permet de déterminer le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. La photostabilité de l'accepteur Cy5 est beaucoup moins élevée que la Cy3. L'optimisation de la performance optique se fait par l'addition

d'un tampon d'imagerie contenant un système d'élimination d'oxygène (acide protocatéchique et 3,4-dioxygénase protocatéchique) qui prévient le photo-blanchiment (provenant principalement de la Cy5 dans la paire Cy3-Cy5). Cependant, il augmente le temps de résidence des états triplet, provoquant des éteignements temporaires pouvant se produire chez tous les fluorophores. Un atténuateur d'état triplet, le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique), est utilisé afin de prévenir ces éteignements indésirables.

Fluorophore	Longueur d'onde d'excitation maximale (nm)	Longueur d'onde d'émission maximale (nm)	Coefficient d'extinction molaire ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Rendement quantique de fluorescence
Fluorescéine (Alexa 488)	490	525	73 000	0,92
Cyanine 3	555	570	150 000	0,31
Cyanine 5	646	662	250 000	0,2

Tableau 1.2 : Propriétés spectroscopiques de fluorophores utilisés pour des expériences de FRET. La longueur d'onde d'excitation maximale est la longueur d'onde où le fluorophore absorbe le plus d'énergie, ce qui permet le passage du fluorophore dans un état excité. Ensuite, le fluorophore libère son énergie par l'émission de lumière à une longueur d'onde plus correspondant à la longueur d'onde d'émission maximale. Le coefficient d'extinction molaire donne un indice sur la quantité de lumière absorbée par le fluorophore à une longueur d'onde spécifique. Le rendement quantique est un ratio situé entre 0 et 1 et correspond au nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbé. Référence : Détaillant de fluorophores commerciaux Lumiprobe™.

Le calcul de l'efficacité du FRET (E_{FRET}) est représenté à l'équation 1.1.

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

Équation 1.1 : Calcul de l'efficacité de transfert d'énergie par résonance de type Förster (eFRET). R représente la distance entre le donneur et l'accepteur, et R_0 , appelé distance de Förster, représente la distance à laquelle l'efficacité de FRET est à 50 %.

Le changement de FRET est très sensible à la distance et son échelle de distance varie entre 2 et 8 nm (Clegg, 1995). Cette échelle de distance est pertinente dans de nombreux systèmes biologiques comme l'ARN, car la longueur d'une double hélice complète de ~11 paires de base équivaut à ~2,5 nm (Watson, 2004). Les deux fluorophores le plus couramment utilisés pour les expériences de sm-FRET sont la Cy3 et la Cy5, car ils possèdent une distance de Förster ~5,3 nm, qui est une distance pertinente pour l'étude du repliement d'ARN. La résolution cristallographique connue d'un ARN facilite l'anticipation de la sélection des différentes possibilités d'emplacements de la paire de fluorophores et permet de respecter la distance de l'efficacité de FRET. La résolution mathématique de la distance de Förster R_0 dépend des propriétés spectroscopiques des fluorophores et du milieu, ce qui amène l'équation 1.2 où ϕ_D est le rendement quantique du fluorophore donneur, $J(\lambda)$ est l'aire sous la courbe du chevauchement entre le spectre du donneur et de l'accepteur, N est le nombre d'Avogadro, n est l'indice de réfraction du milieu et κ^2 le facteur d'orientation.

$$R_0^6 = \frac{0.529 \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J(\lambda)}{N \cdot n^4}$$

Équation 1.2 : Calcul de la distance de Förster (R_0).

Le degré de liberté de la rotation du fluorophore (sa mobilité dans l'espace), en relation avec le facteur d'orientation κ^2 , est un facteur important à considérer dans le calcul de FRET. Cette valeur peut être entre 0 et 4. Si le fluorophore subit une réorientation isotropique (c'est-à-dire dans n'importe quel sens dans l'espace) dans un laps de temps plus court que la durée de vie de l'état excité du donneur, le facteur κ^2 est approximé à une valeur de 2/3. En d'autres mots, lorsque $\kappa^2 = 2/3$, l'orientation des fluorophore n'est pas prise en compte dans le calcul de la distance de Förster. Cette approximation est valable lorsque des fluorophores peuvent bouger librement comme une fluorescéine attachée sur l'extrémité d'une hélice d'ARN. Cependant, les cyanines se comportent différemment dans le même contexte étant donné qu'elles peuvent s'empiler sur la dernière base de l'hélice d'ARN. Les cyanines sont plus contraintes dans l'espace lorsqu'elles peuvent être empilées sur une extrémité d'hélice, ce qui augmente l'effet de l'orientation des fluorophores. Une équipe de recherche a utilisé ce principe pour caractériser la périodicité d'une hélice d'ADN et un hybride ADN/ARN (Iqbal et al., 2008).

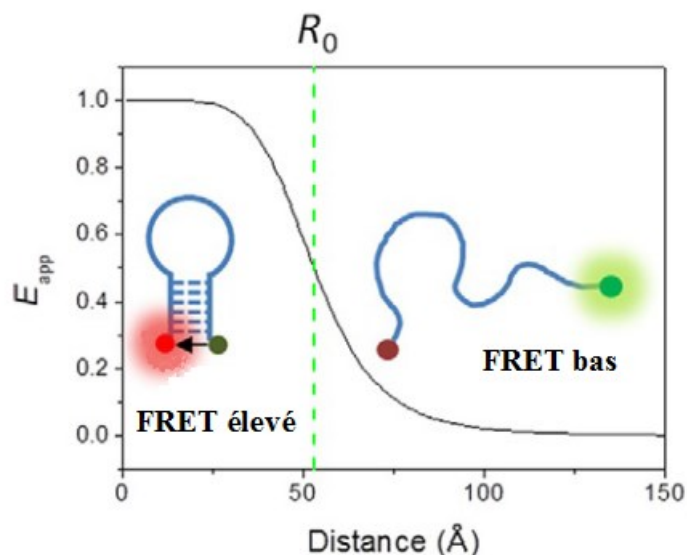


Figure 1.12. Transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET). Plus la distance (en angström) entre les deux fluorophores est faible, plus l'efficacité de FRET augmente. Dans un cas de FRET élevé, la Cy3 (en vert) transfère son énergie à la Cy5 (en rouge) qui émet plus de fluorescence (Figure adaptée de Shaw et al., 2014).

1.4.2 Principes du transfert d'énergie par résonance de type Förster à l'échelle de la molécule unique (sm-FRET)

La possibilité de suivre les changements conformationnels de molécules individuelles grâce au sm-FRET permet de diviser les populations d'ARN selon leurs valeurs d'efficacité de FRET. Ces valeurs peuvent être hétérogènes, ce qui peut se refléter dans le mécanisme de repliement et sur la cinétique du comportement des molécules. L'étude à l'échelle moléculaire possède l'avantage de pouvoir enlever les molécules non fonctionnelles ou partiellement marquées, ce qui diminue considérablement le nombre d'artéfacts indésirables lors de la prise de résultats (Shaw and St-Pierre, 2014).

Au sm-FRET, les molécules peuvent diffuser librement ou être attachées sur une surface. Lorsque l'aptamère est immobilisé sur une surface, son signal fluorescent peut être suivi dans le temps, ce qui donne de l'information sur son repliement en temps réel. Il existe de

nombreuses façons d'immobiliser un ARN sur une lame de microscope. Une méthode largement utilisée est la liaison d'un brin d'ARN synthétique contenant une biotine se liant sur un complexe BSA-biotine-streptavidine préalablement incubé sur une lame (voir Fig. 1.13). Un microscope à fluorescence est utilisé pour détecter les signaux de fluorescence émis par les fluorophores, qui sont marqués chimiquement sur un aptamère d'un riborégulateur. Le fluorophore donneur (dans ce cas le Cy3) est excité par un laser avec sa longueur d'onde spécifique (voir tableau 1.2). La méthode d'excitation utilisant la réflexion totale interne (TIR) permet de créer un champ d'excitation grâce à une onde d'évanescence. Cette méthode d'excitation possède l'avantage d'étendre la lumière du laser à seulement 100 à 200 nm à la surface à laquelle l'échantillon fluorescent est attaché. Ce phénomène réduit de façon considérable le bruit de fond fluorescent et améliore la qualité optique. Un miroir dichroïque permet la séparation des spectres d'émission du donneur et de l'accepteur. Une caméra CCD (dispositif à couplage de charge) permet de filmer simultanément l'émission des deux fluorophores, ce qui nous permet de calculer une valeur de FRET dans le temps. Différentes variations de conditions expérimentales, comme le changement de la concentration du cofacteur métallique ou de ligand, permettent d'induire ou stabiliser certaines conformations des aptamères fluorescents en cours d'étude (Rahul et al., 2008) (Shaw and St-Pierre, 2014).

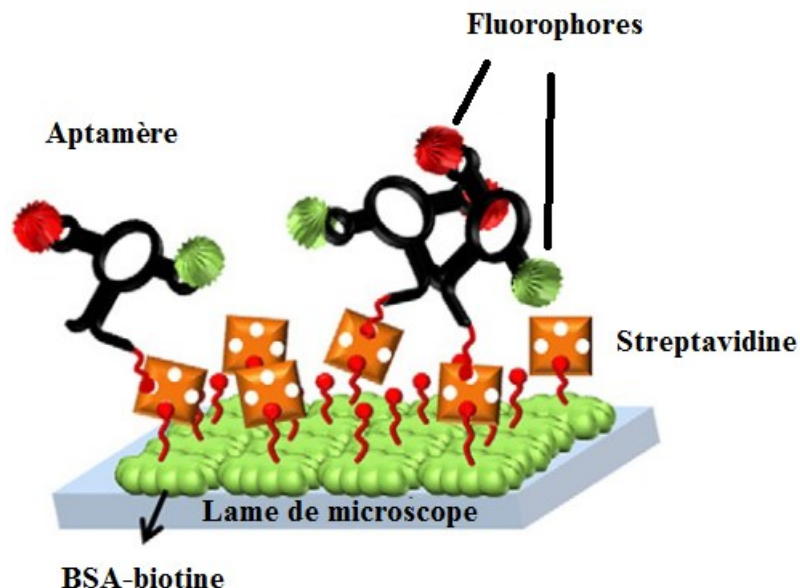


Figure 1.13. Schéma d'un échantillon fluorescent immobilisé sur une lame de microscope utilisant des interactions non covalentes entre de l'albumine bovine biotinylée (BSA) et la streptavidine pour une expérience de sm-FRET (Figure adaptée de Shaw et al., 2014).

1.5 Objectifs de maîtrise

1.5.1 Caractériser l'état intermédiaire (F_{Mg}) de l'aptamère du riborégulateur SAM-I pour *yitJ* et *fn02*

Durant la dernière décennie, les riborégulateurs ont commencé à prendre beaucoup de place dans la littérature scientifique. Étant donné que les changements de structures sont directement reliés avec leur fonction, les riborégulateurs constituent un excellent modèle pour comprendre le repliement de l'ARN. Plusieurs résolutions de cristaux ont permis d'élucider les structures natives des aptamères liés à leurs ligands. Cependant, il n'y a pas beaucoup d'information sur les structures intermédiaires qui font le pont entre une structure non repliée d'ARN et sa structure repliée fonctionnelle. Concernant le SAM-I, il y'a peu

d'information sur la formation de l'état F_{Mg} ainsi que la formation de l'état F_{NS} en absence du ligand. Cela nous amène à une question fondamentale : qu'est-ce qui est nécessaire au repliement de l'aptamère pour qu'il puisse en arriver à reconnaître spécifiquement un ligand? Grâce aux structures cristallines, nous pouvons avoir beaucoup d'information sur les nucléotides impliqués dans la liaison du ligand ainsi que le réarrangement global final de l'ARN. Cependant, il manque le dynamisme structural qui se passe dans la formation de l'état non replié vers l'état replié, car la cristallographie donne seulement l'information concernant la dernière conformation stable dans laquelle l'aptamère s'est trouvé, soit l'état replié. C'est pourquoi le sm-FRET constitue une technique intéressante pour étudier le repliement d'un ARN en temps réel. Les aptamères *yitJ* et *fn02* constituent deux modèles intéressants à étudier, car certaines études structurales ont déjà été effectuées dans notre laboratoire (Heppell et al., 2011).

1.5.2 Caractériser la rotation de la tige P1 de l'aptamère du riborégulateur SAM-I

Un phénomène moléculaire unique se passe dans le repliement de l'aptamère du riborégulateur SAM-I, soit la stabilisation d'une rotation de la tige P1 suite à sa liaison au ligand. La seule exception qui a été caractérisée dans la littérature jusqu'à ce jour est la rotation de l'ARN ribosomal (ARNr) (voir section 1.1.3). La sous-unité 30S entre en rotation par rapport à la grande sous-unité 50S, qui sont toutes les deux composées de protéines et d'ARNr. Cette rotation s'effectue suite à la liaison du facteur EF-G et l'hydrolyse subséquente du GTP, étapes essentielles à un bon fonctionnement de la traduction. Étant donné que cette rotation semble agir dans un processus qui est essentiel et conservé chez tous les organismes vivants, il serait intéressant d'en connaître plus sur la rotation du riborégulateur SAM-I. La rotation de la tige P1 peut être observée grâce à des gels d'électrophorèse natifs (CGE) et de sm-FRET. Le mémoire se concentre principalement sur les expériences de sm-FRET, étant donné que cette technique donne plus d'information concernant le dynamisme structural du repliement des aptamères. Grâce au sm-FRET et de la dépendance de l'orientation de paires de fluorophores empilés en bout

d'hélice, une rotation artificielle par l'allongement de la tige P1 et P3 a permis de caractériser la rotation de la tige P1. Aussi, des prédictions bio-informatiques ont permis d'appuyer ce modèle.

CHAPITRE 2

ARTICLE SCIENTIFIQUE

2.1 Préambule et présentation de l'article scientifique

En 2011, notre équipe a caractérisé le mécanisme de repliement du riborégulateur SAM-I en deux étapes (Heppell et al., 2011). La première étape concerne la formation de l'état intermédiaire par la liaison du magnésium et la deuxième implique la liaison de SAM qui forme l'état replié. D'ailleurs, la suite logique de cet article est présentée dans le prochain chapitre de ce mémoire sous forme d'article scientifique. Ce chapitre s'intéresse à l'inhibition spécifique de changements conformationnels du riborégulateurs SAM-I, plus particulièrement la rotation de la tige P1, par l'intermédiaire de mutation de différents nucléotides clés. De plus, un intérêt particulier a été porté sur l'implication de la tige P4 non-conservée dans le repliement de l'aptamère.

Dans ce chapitre, nous démontrons que l'absence de la tige P4, augmentant la flexibilité du cœur de l'aptamère, favorise la rotation de la tige P1. D'ailleurs, la tige P4 est impliquée dans l'empilement hélicoïdal entre la tige P1 et P4 lors de la liaison de SAM. La mutation d'une paire de base essentielle du cœur, affectant l'empilement hélicoïdale de P1 et P4, favorise également la rotation de la tige P1. Nous avons également démontré que même lorsque le groupement sulfonium de SAM n'interagit plus avec l'aptamère, la rotation de P1 demeure inchangée. Ce résultat a été confirmé avec un analogue de SAM ne contenant pas de groupement sulfonium, le SAH. Les expériences de 2-aminopurine nous démontrent que le cœur de l'aptamère ne possédant pas de tige P4 est grandement affecté par la liaison du magnésium. Somme toute, la flexibilité du cœur de l'aptamère pourrait être la cause de la rotation de la tige P1.

L'ensemble de ces expériences nous permettent de conclure que l'étude en temps réel du repliement d'un riborégulateur donne de l'information sur les différents changements conformationnels, qui peuvent être bloqués par des mutations spécifiques de nucléotides. Il s'agit du premier travail concernant l'étude d'une rotation d'une tige d'ARN par la liaison d'ions métalliques et de ligand.

Contribution des auteurs : Julien Boudreault a conçu les expériences en collaboration avec Daniel Lafontaine et Carlos Penedo. Julien a également effectué toutes les expériences concernant le sm-FRET et a écrit l'article scientifique en entier. Daniel Cibran Perez-Gonzalez a analysé quelques films de sm-FRET (environ 10%). Benoît Heppell a effectué les expériences de 2-aminopurine.

Dans la mesure du possible, l'article sera soumis à Nucleic Acids Research.

Article scientifique : SAM-I riboswitch mutagenesis reveals clues on a unique ligand dependent stem rotation mechanism at single-molecule level.

Julien Boudreault¹, Daniel Cibran Perez-Gonzalez^{2,3}, Benoît Heppell¹, Carlos Penedo^{2,3} and Daniel Lafontaine^{1*}

¹RNA Group, Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec

²SUPA, School of Physics and Astronomy, University of St Andrews, St Andrews, Fife, KY16 9SS, UK

³Biomedical Sciences Research Complex, University of St Andrews, St Andrews, Fife, KY16 9SS, UK

1. Groupe ARN/RNA Group, Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada. 2. School of Physics and Astronomy, University of St. Andrews, St. Andrews, Fife, United Kingdom. 3 Biomedical Sciences Research Complex, University of St. Andrews, St. Andrews, Fife, United Kingdom. *e-mail: Daniel.Lafontaine@USherbrooke.ca or jcp10@st-andrews.ac.uk

* To whom correspondence should be addressed. Tel: [+1 819 821 8000 #65011]; Fax: [+1 819 821 8049]; Email: [Daniel.Lafontaine@usherbrooke.ca]

Present Address: [Daniel Lafontaine] Biology department, faculty of science, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 2500 boul. de l'Université, QC J1K 2R1, Canada

2.2 Abstract

S-Adenosylmethionine (SAM) riboswitches are metabolite-sensing RNA elements that regulate gene expression in bacteria. Numerous structural studies helped the elaboration of the architecture and structural behavior of the aptamer, such as biochemical, crystallographic and bioinformatics approaches. However, little information is given about what is necessary for the unique mechanism involving the helical rotation of P1 stem and the implication of the non-conserved P4 stem in the global folding. Here, we report that the

lack of the non-conserved P4 stem accentuates an ionic-dependent rotation of P1 stem, which is detected by sm-FRET. It is shown that P4 stem serves as a core-scaffold element and could be replaced by magnesium in SAM-I aptamer lacking P4. Also, the same behavior is observed with the U114A core base pair mutant, which locks the aptamer into its rotated conformation. We find that the lack of the pseudoknot, which is a crucial element for ligand recognition, completely blocks P1 rotation. We report that P3 binding mutant does not affect ionic-dependent rotation of P1 stem, but does not stabilize ligand-dependent P1 rotation. To date, it is the first time that a rotation upon ion and ligand binding in a RNA element has been blocked and characterized in real-time.

2.3 Introduction

Riboswitches are metabolite sensing RNA elements located in untranslated region of mRNA. These RNA regions have been found in the three domains of life and shown to regulate gene expression by a complex interplay between ligand binding, cofactor interactions and two mutually exclusive folding structures (Breaker, 2012). The genetic control is carried out through numerous cellular factors recognition such as amino acids, nucleic acids, metallic ions, small metabolites and physicochemical parameters like pH and temperature (Serganov and Nudler, 2013). The riboswitch structure is composed of two domains: an aptamer and an expression platform. The aptamer is the most conserved and structured region and participates in the specific recognition of a target metabolite. The expression platform, which nucleotide sequence is highly variable, determines the consequence of the genetic regulation process mostly through secondary structure reorganization. The interplay between these two mutually exclusive structures control gene expression at different level such as transcription (Epshtein et al., 2003), translation (Winkler et al., 2002), splicing (Kubodera et al., 2003), siRNAs (Loh et al., 2009), self-cleavage (Winkler et al., 2004) and mRNA decay (Caron et al., 2012). Also, riboswitches have also been shown to be promising targets for the prospection of new antibiotics (Blount

et al., 2007)(Blount and Breaker, 2006) and engineering of inducible gene regulation elements (Lucks et al., 2008)(Lucks et al., 2011).

The S-adenosylmethionine (SAM) riboswitch group is found in almost every type of bacteria and controls gene expression involved in the metabolic pathway, biosynthesis and transport of essential metabolites such as cysteine, methionine and SAM (Wang et al., 2008) (Robert T. Batey, 2011). Among all different SAM riboswitches, SAM-I *Bacillus subtilis* was the first SAM riboswitch family discovered (Epshtein et al., 2003)(Winkler et al., 2003) and is by far, the mostly studied (Price et al., 2014). The structure of the four-way junction *yitJ* aptamer (fig. 1a) was firstly characterized by Breaker research group through in-line probing technique, which reveals the location of structured and unstructured portions of RNA by relying on the variability rates of spontaneous RNA phosphodiester cleavage. They also tested its regulatory activity through *in vitro* transcription and *in vivo* lacZ gene reporter assays (Winkler et al., 2003). Indeed, SAM-I family controls gene expression of its target genes at the level of transcription termination, with the exception of *Listeria monocytogenes* that uses a different mechanism that acts in *trans* independently of SAM (Loh et al., 2009). Low concentration of SAM ligand favors an antitermination stem structure whereas higher concentration stabilizes an alternative structure competing with the antiterminator, which induces transcription termination. Batey group found that the SAM aptamer displays a high affinity for its ligand ($K_d \sim 20$ nM) and can discriminate similar analogs like S-adenosylhomocysteine (100 fold) by specifying the charged sulfonium ion in SAM (Montange et al., 2010). Also, the three families of SAM riboswitches that has been discovered share a similar binding mechanism which implicates interactions of the sulfonium group with the P1 for the discrimination between SAM and SAH (Price et al., 2014)(Tausch et al., 2014). Formation of P1 stem upon ligand binding is a key conformational change in the folding steps of many riboswitches (Montange and Batey, 2006) and links the aptamer with the expression platform. In the case of the SAM-I riboswitch, the formation of P1 sequesters the antiterminator and liberates a Rho independent terminator that terminates transcription (Serganov and Nudler, 2013).

Crystal structure resolution of the *Thermoanaerobacter tengcongensis* *yitJ* SAM-I (fig. 1b) has revealed a four-way junction (P1-P4) RNA containing a central ligand-binding core organized by a peripheral subdomain, defined by a pseudoknot between L2 and J3/4 region and two sets of coaxially stacked helices, between P1-P4 and P2-P3, which are oriented relatively to each other with an angle of $\sim 70^\circ$ (Montange and Batey, 2006). Few years later, the crystal structure of the *yitJ* aptamer of *Bacillus subtilis* has been solved by Lu group and shows similar features of the previously characterized crystal, which shows that SAM-I riboswitches family uses a conserved ligand recognition mechanism (Lu et al., 2010). SAM, bound to the aptamer, is located in the binding core and stabilized through interaction of his sulfonium moiety with the P1 stem, his adenine ring with the helix P3 and his methionine tail between the P3 stem and J1/2 (Montange and Batey, 2006). Features of the unbound state of the SAM-I riboswitch have been elucidated by Batey and Sanbonmatsu group by small angle X-ray scattering (SAXS) and implicate magnesium-dependent multiple folding transitions like P1-P3 stem open-closed transitions and a compacted configuration similar to the bound aptamer (Stoddard et al., 2010). Sanbonmatsu group showed that ligand binding of the aptamer forms specific tertiary interactions that shift the equilibrium from an open state to a more compact structure. Liley group found that the formation of the kink-turn of SAM-I riboswitch, which is a common structural motif that bend the RNA helix, also supports long-range tertiary interactions (Lilley, 2014)(Schroeder et al., 2011). Our lab found that pseudoknot mutation disrupts the global architecture of the aptamer and lowers SAM binding affinity (Heppell and Lafontaine, 2008).

We have previously shown a two steps hierarchical folding mechanism of SAM-I (fig. 1c) involving conformational changes in the RNA architecture (Heppell et al., 2011). In the first step, SAM aptamer undergoes a Mg^{2+} dependent folding process characterized by the formation of the P2-P3 helical stacking and close juxtaposition of P1 and P3 helices, which are dependent on the kink-turn and pseudoknot interaction. In the second step, binding of

SAM produces both P1-P4 coaxial stacking and P1 antiterminator stem rotation. The latter conformational change is the only ligand-dependent helical rotation that has been observed in any biological system and could also be found in other riboswitches. Given the fact that P1 formation is crucial for switching gene expression in many riboswitches, we hypothesized the importance of the helical rotation of the P1 stem upon ligand binding. We tried to link the helical rotation with the ligand interaction that occurs within the P1 stem and P3 stem and test the implication of the non-conserved P4 stem of SAM-I riboswitch. Therefore, this led to a series of single-molecule FRET (sm-FRET) experiment detecting the P1 rotation in real-time with different mutated *yitJ* aptamers. We found that interaction of P1 with the sulfonium moiety of SAM is not the cause of the helical stem rotation. Also, we showed that an aptamer lacking the non-conserved P4, the three-way junction aptamer *fn02*, can rotate its P1 helix which states that the stacking of P1-P4 is not linked with the helical rotation. We report that the mutagenesis of the base-pair core U114/A138 locks the aptamer in its rotated conformation in Mg^{2+} condition and shows a similar conformational behavior as the aptamer lacking the P4.

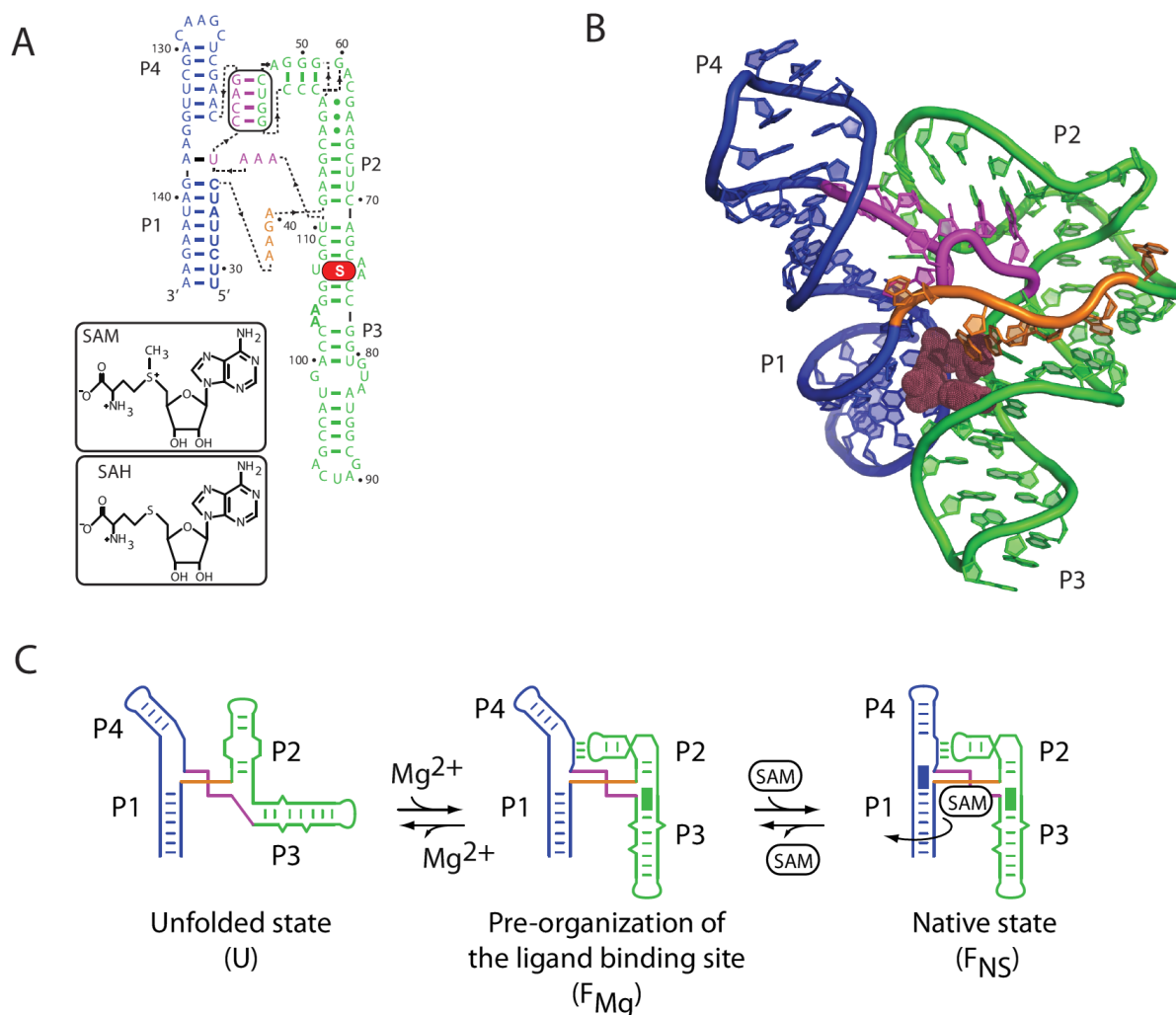


Figure 2.1: Representation of SAM aptamer and its folding mechanism induced by ion and ligand binding. (A) Secondary structure of the SAM-I riboswitch aptamer domain reflecting the tertiary organization. Solid arrows represent the direction of the RNA backbone. Colors used to denote elements of structure are consistent with subsequent figures. The pseudoknot is shown inside a rounded rectangle. Dotted lines indicate the polarity of the sequence. The ligand position is represented by an uppercase S in an oval. The chemical structure of SAM and its chemical derivative SAH are also shown. The numbering of nucleotides is based on previous studies. (B) Ribbon representation of the three-dimensional 2.9-Å resolution crystal structure of an S-adenosylmethionine (SAM)-

responsive riboswitch from *Thermoanaerobacter tengcongensis* complexed with S-adenosyl- methionine. (C) Folding and ligand recognition mechanism of the SAM-I riboswitch. Conformational changes between the unfolded state (U), the Mg^{2+} -induced (F_{Mg}) and the native state (F_{NS}) are shown. The binding of magnesium ions to the riboswitch aptamer preorganizes the ligand binding site to yield the F_{Mg} state. This structural conformer is characterized by the formation of the P2-P3 helical stacking (black rectangle), the pseudoknot interaction and the close juxtaposition between stems P1 and P3. SAM binding to the aptamer produces the F_{NS} state in which the formation of the P1-P4 helical stacking (black rectangle) and the rotation of the P1 helix (curved arrow) take place. The organization of the aptamer in the U state is arbitrary as no information is available about the exact position of each stem.

2.4 Material and methods

RNA synthesis and purification

RNAs with more than 90 nucleotides were transcribed from a dsDNA template (Integrated DNA technologies Inc.) that has been made previously by polymerase chain reaction. RNAs with less than 90 nucleotides were transcribed from a template constituted of two hybridized oligonucleotides issued from denaturation in a bloc heater from 95°C to 37°C in 1 hour. The T7 RNAP promoter was used for all transcription experiments. (Milligan et al., 1987) Transcription was incubated 3 hours at 37°C in a transcription buffer (40mM Tris-HCl pH 7.9, 20mM $MgCl_2$, 2mM spermidine, 0.01% V/V triton X-100, 1mM dithiothreitol, 250 μ M rNTP and 1pM DNA template). Transcription products were purified on a preheated (18W for 30 minutes) 10% acrylamide/bisacrylamide (19:1) denaturant gel at 18W for 2h in TBE buffer (90mM Tris, 88mM boric acid, 2mM EDTA and 8M urea) and recovered by electroelution in 8M ammonium acetate buffer followed by ethanol precipitation.

Labelling and preparation of fluorescent RNA complexes

Synthetic RNA molecules (Integrated DNA technologies Inc.) contain nucleotide modification(s) at defined positions for RNA biotin-mediated tethering on a microscope plate (5' biotin: /5Biosg/) and internal and/or terminal primary amino linker (/iAmMC6T/ or 3' terminal primary amino linker: /3AmMC6T/) for fluorophores incorporation. Chemistry of NHS ester fluorophore (Amersham Bioscience, division of GE Healthcare) incorporation at primary amino linker's position is described in Brenner's experimental procedures (Brenner et al., 2010).

2-amino-purine assays

Fluorescence spectroscopy was performed on a Quanta Master fluorometer. All data were collected at 15°C in 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 25 mM NaCl in presence or absence of 10 mM MgCl₂ and in presence or absence of 5 μM SAM. The fluorescence of a 2AP incorporated at position 110 is dependent on SAM binding. For each experiment, at least three measurements were done.

All RNA strands were produced by T7 transcription, except 2AP-containing RNA oligonucleotides that were purchased from IDT, purified as described previously. Complete SAM-2AP aptamers were assembled from oligonucleotides of the following sequences (all written 5' to 3'):

2AP construct monitoring the four-way junction *yitJ*: Strand P1-P4:

GCGCAUAUCCGUUCUUAUCAAGAGAAGCAGAGGGACUGGCCCCGACGAAGCU
UCAGCAACCGGUGUAAUGGCGAUCAGCCAUGACCAAGGUGCUAAAUCCAGCA
AGCUGCGC;

Strand P4-P1:

5'-PO4-UUAAAGCAGCUUGGA(2AP)GAUAAGAACGGAU.

2AP construct monitoring the three-way junction *fn02*:

Strand P1-P3a:

GCGUCUCCAUCCAGAGAAACGGAGGGACUGGCCCAAUGAUGUUUCAGCAACC
UACUU

Strand P3b-P1:

5'-PO4-AAAUGUGUGGUGCUAAUCCAGAG(2AP)GAUGGAGA

Mutants were also prepared with the sequence changes indicated in the text. Purified 5' and 3' RNA strands were annealed by heating a mixture (molar ratio 1.5:1) to 65°C in 10 mM Hepes (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, and slowly cooled to 25°C. T4 RNA ligase (New England BioLabs) was then added to the reaction to ligate RNA molecules (strand P1-P3a with strand P3b-P1), and samples were incubated at 37°C for 3 h. Full-length ligated RNA molecules were purified by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and electro-elution. The RNA was precipitated with ethanol and redissolved in water. RNA concentration was measured by absorption of light at 260 nm. The ligated P1-P3a/P3b-P1 RNA strand was further used in a slow cooling process, as described above, with the strand P3-P1 to reconstitute the complete SAM aptamer.

Single-molecule total-internal reflection

Single-molecule FRET experiments were performed as previously reported where all experimental procedures are explained. FRET trajectories were acquired from immobilized single-molecules using a prism type total-internal reflection setup that includes an inverted microscope (Olympus IX71) coupled to a 532 nm laser (Crystalaser, USA) and a back illuminated Ixon EMCCD camera (Andor, UK) (Boudreault et al., 2015). Donor and acceptor fluorescence emissions were separated using dichroic mirrors (DCRLP, Chroma Technology) and imaged onto the left (donor) and right (acceptor) half-chip of the EMCCD. This setup allowed to monitor the Cy3 and the Cy5 signals simultaneously.

The sequence of the four-way junction *yitJ* aptamer for sm-FRET assays was assembled from oligonucleotides of the following sequences (all sequences are written in the 5' to 3' direction) and mutants were also prepared with the sequence changes indicated in the text:

P1-P3 strand (Transcribed using T7 RNA polymerase):

GCGUUCUUAUCAAGAGAAGCACAGGGACUGGCCCCGACGAAGCUUCAGCAACC
UGCCAAGCGUUCUCUCGC

P3 strand (Synthetic strand from IDT with internal fluorophore Cy5 and 5' biotin):

Biotin-GCGAGAGAACGC/iAmMC6T/UG

P3-P4 strand (Transcribed using T7 RNA polymerase):

GCGGGUGCUAAAUCCAGCAAGCUGCGC

P4-P1 strand (Synthetic strand from IDT with 5' fluorophore Cy3):

GCGCAGCUUGGAAGAUAGAACGC/3AmMC6T/

The sequence of the three-way junction *fn02* aptamer for fluorescence assays was assembled from oligonucleotides of the following sequences (all sequences are written in the 5' to 3' direction):

P1-P3 strand (Transcribed using T7 RNA polymerase):

GCGUUCUUAUCAAGAGAAGCACAGGGACUGGCCCCGACGAAGCUUCAGCAACC
UGCCAAGCGUUCUCUCGC

P3 strand (Synthetic strand from IDT with internal fluorophore Cy3 and 5' biotin):

Biotin-GCGAGAGAACGC/iAmMC6T/UG

P3-P1 strand ((Synthetic strand from IDT with 3' fluorophore Cy5)

GCGGGUGCUAAAUCCAGGAAGAUAGAACGC/3AmMO/

2.5 Results

Implication of the non-conserved P4 stem in the rotation of P1 stem

A vector containing a pair of fluorophores located on the P1 (cy3) and P3 (cy5) stem (vector 1-3) has been used to monitor real-time conformational changes upon ion and ligand binding of the previously characterized *yitJ* riboswitch of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* (Lu et al., 2010)(Heppell et al., 2011). This vector has been experimented with sm-FRET technique, which is useful for nucleic acids junction studies. It has the advantage of giving information about the dynamic structural changes in individual RNA molecules in comparison to traditional bulk assays that give the average conformational value of a batch of molecules. After sm-FRET population histogram analysis of vector 1-3 experimented in different salt (NaCl), ion (Mg^{2+}) and ligand (SAM) conditions, we observed the presence of different FRET efficiencies (E_{FRET}) values that correspond to specific conformations of the aptamer. An E_{FRET} value of 0.35 (fig. 2a) is observed in 50mM NaCl condition and corresponds to the unfolded state. Each value for the unfolded state is nearly the same for every mutant in this paper and shows that the unfolded structure is not perturbed by the mutations. This unfolded state represents the aptamer in a disorganized state that is not competent to bind SAM ligand. In fact, Mg^{2+} ions binding to the RNA aptamer is crucial for SAM recognition (fig. 1c) and causes the apparition of an E_{FRET} value of 0.47 (fig. 2a) that corresponds to the F_{Mg} state, defined by the close juxtaposition of P1-P3 stem. This intermediate state, also called the preorganization of the ligand-binding site, has been previously characterized by bulk-FRET experiment and native gel electrophoresis (CGE) by our lab (Heppell et al., 2011). Also, in Mg^{2+} condition, a third E_{FRET} value of ~ 0.65 is exhibiting at a contribution much lower than F_{Mg} state and seems to be a mixture of fast transitions between F_{Mg} and F_{NS} . Perhaps, the fast transitions between those two states observed in the molecule's FRET time trajectories (Supplementary fig. S1a) could lead to an inaccurate lower average value of the real F_{NS} state as observed in SAM condition. Indeed, a higher value of ~ 0.75 E_{FRET} in SAM condition (fig. 2a), which

characterizes the F_{NS} state, corresponds to the rotation of P1 stem of the aptamer which is stabilized by ligand binding. This rotation has been confirmed earlier by our lab through CGE which involves an elongation of P1 and P3 stems and an addition of an axial bend in the P1 stem that accentuates the electrophoresis migration pattern between rotated/un-rotated P1 (Heppell et al., 2011).

Hereafter, an aptamer lacking the P4 stem has been tested with sm-FRET and 2-aminopurine fluorescence assays to compare the influence of the presence/absence of the P4 stem. The three-way junction *fn02* is a natural variant from the gram-negative bacteria *Fusobacterium nucleatum* that is found upstream of a gene involved in an ABC-transporter. The sequence and structure of *fn02* is in agreement with the consensus sequence including variation in the length of P3 stem except that it does not contain the non-conserved P4 stem as the *yitJ* aptamer. The kink-turn, pseudoknot and nucleotides involved in ligand recognition are conserved as well as the U114-A138U (U114-A121 for the *fn02* aptamer) conserved base pair in the core of the aptamer. The vector 1-3 of *fn02* used for sm-FRET experiments contains the Cy3-Cy5 fluorophores pairs exactly at the same place as the *yitJ*, which permits a valid comparison of the FRET values obtained between the two SAM-binding aptamer. The two aptamer responded quite differently in $MgCl_2$ condition (fig. 2b). Indeed, the ratio of F_{NS}/F_{Mg} FRET population of *fn02* is higher than *yitJ* at the same magnesium concentration. F_{NS} formation of the three-way junction aptamer is also observed at much lower $MgCl_2$ concentration such as 0.4mM, whereas F_{NS} is not observed for the four-way junction aptamer. Furthermore, fast transitions between F_{Mg} and F_{NS} have been observed in low Mg^{2+} concentration (Supplementary fig. S1e). To conclude, it may indicate a stronger ion-dependent reorganisation of the aptamer in the absence of the non-conserved P4 stem.

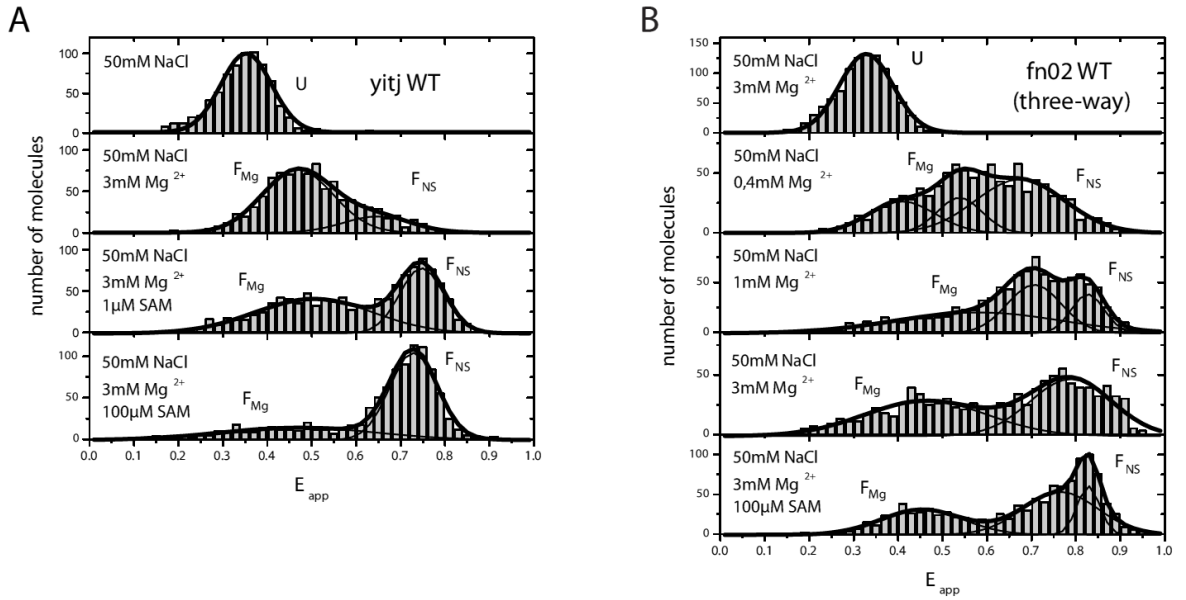


Figure 2.2: Single-molecule FRET analysis of the P1-P3 folding transition of *yitJ* and *fn02* with vector 1-3. The construct used for sm-FRET experiments is shown on fig.3 for *yitJ* and fig.4 for *fn02* on the top of the histograms. Single-molecule histograms of FRET efficiency of *yitJ* WT (A) and *fn02* (B) as a function of magnesium and SAM concentration are shown. Experimental histograms of *yitJ* were fitted to a linear combination (thick lines) of numerous contributing Gaussians (thin lines) showing the relative presence of the unfolded (U, $E_{app} \sim 0.35$), the magnesium-induced state corresponding to the close juxtaposition of P1-P3 (F_{Mg} , $E_{app} \sim 0.45$) and the magnesium/SAM-induced folded native state corresponding to the rotation of P1 (F_{NS} , $E_{app} \sim 0.65$). Experimental histograms of *fn02* showed the relative presence of the unfolded (U, $E_{app} \sim 0.35$), the magnesium-induced state (F_{Mg} , $E_{app} \sim 0.45$) and the magnesium/SAM-induced folded native state (F_{NS} , $E_{app} \sim 0.80$).

Pseudoknot mutation blocks P1 rotation

It has been reported that the pseudoknot mutant blocks specific folding steps, like the P2-P3 helical stacking and the close juxtaposition of P1-P3 stem. This mutation also disrupts riboswitch transcriptional activity (Heppell and Lafontaine, 2008)(Heppell et al., 2011). To

date, there is no real-time experiment that shows specific disruption the aptamer folding steps. We conducted sm-FRET experiments of vector 1-3 lacking a pseudoknot. Results show that the mutation completely hinders the formation of the F_{NS} for both *yitJ* (fig. 3a) and *fn02* (4a) aptamers. Indeed, no transitions between F_{Mg} and F_{NS} have been observed for this mutant (Supplementary fig. S1b). However, it seems that there is a small reorganisation (pre-folding) in Mg^{2+} condition for both aptamers despite that the pseudoknot disruption prevents the P2-P3 helical stacking and the close juxtaposition of P1-P3. This pre-folding is probably caused by magnesium-binding in pockets that are not affected by the pseudoknot mutant or either non-specific ionic interactions.

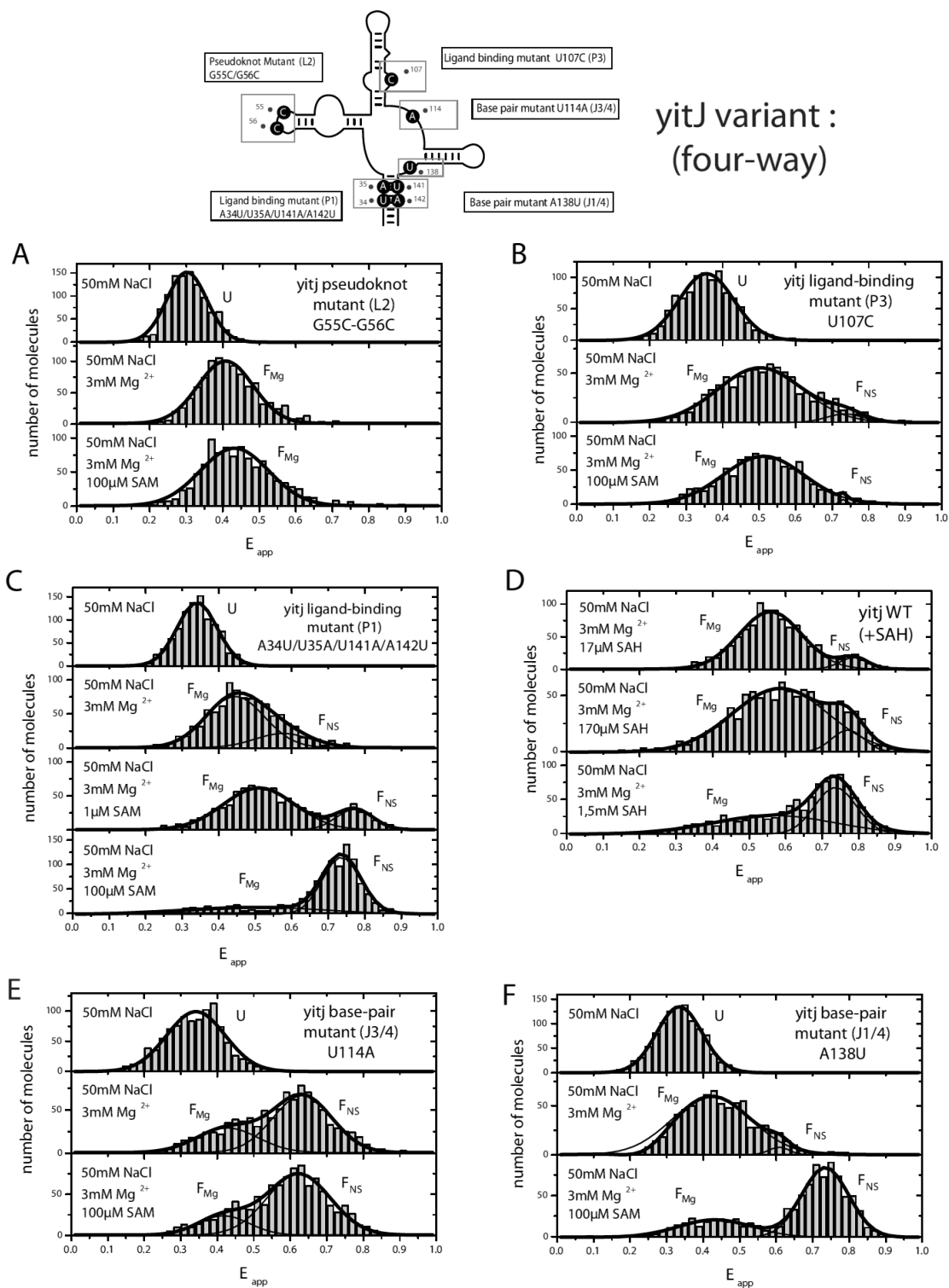


Figure 2.3: Single-molecule FRET analysis of the P1-P3 folding transition of *yitJ* mutants with vector 1-3. The different mutant's sites are shown on the top of the

histograms. Single-molecule histograms of FRET efficiency of *yitJ* pseudoknot mutant (A), P3 ligand-binding mutant (B), P1 binding-mutant (C), WT with SAH addition (D), J3/4 base-pair mutant (E) and J1-4 base-pair mutant (F) as a function of magnesium and SAM concentration are shown. All FRET efficiencies are the same value for the U state, F_{Mg} state and F_{NS} state as the WT except the *yitJ* WT in SAH condition which shows a higher F_{Mg} state $E_{app} \sim 0.55$ instead of ~ 0.45 as all others.

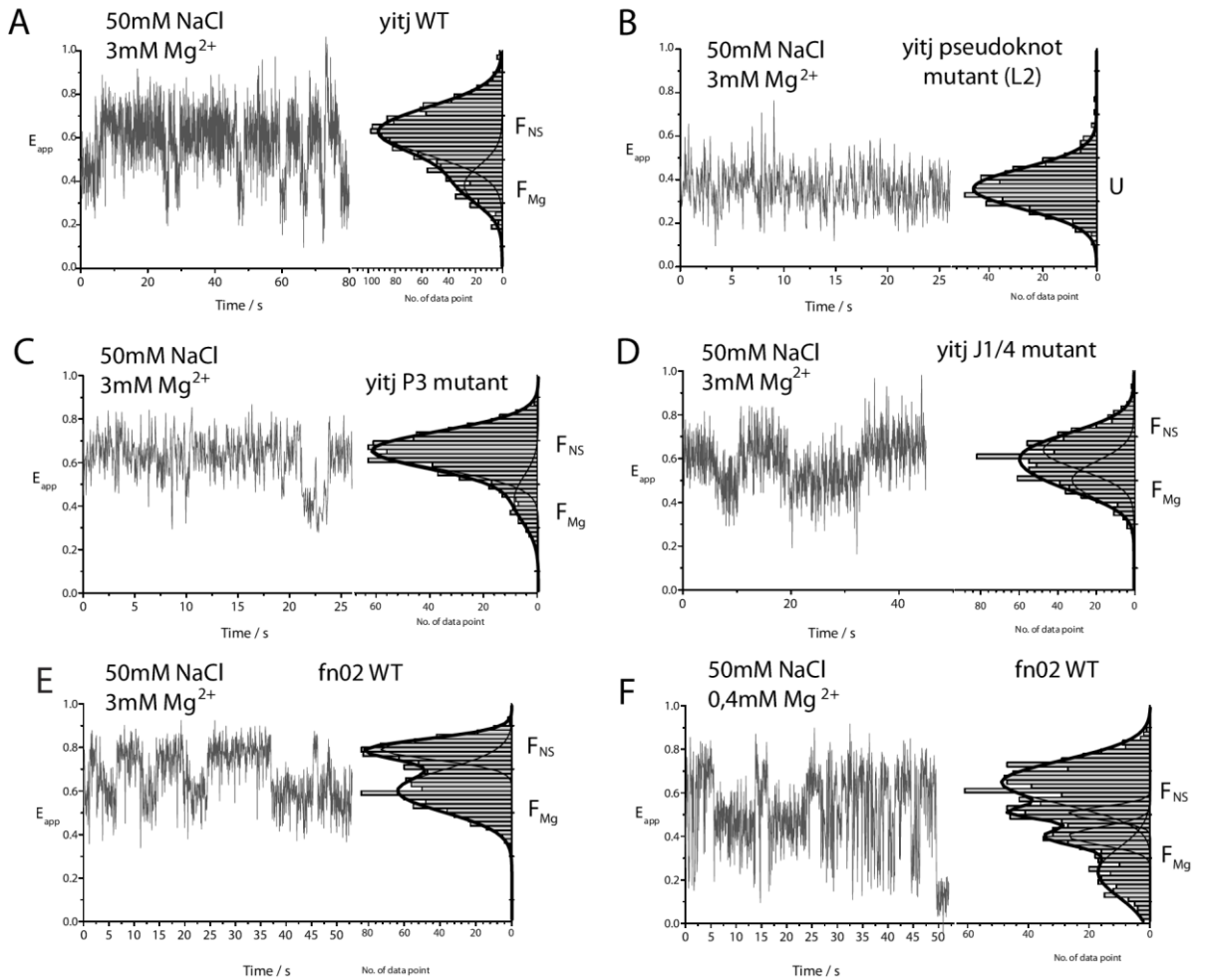


Figure 2.4 (Supplementary figure S1): Single-molecule FRET time trajectories and histograms of *yitJ* and *fn02* vector 1-3 in the presence of Mg^{2+} . (A-C-D-E-F) Multiples FRET state are observed, corresponding to the F_{Mg} and F_{NS} state. (B) A single FRET state is observed, corresponding to the unfolded structure U.

Magnesium binding induction of P1 rotation at a much lower contribution than SAM binding

As the crystal shows, the adenine ring of SAM interacts with the P3 stem through a Hoogsteen base pair with U107 (Montange and Batey, 2006). The P3 mutation U107C has been shown to disrupt the ligand affinity at the highest ratio which brings a complete loss of the riboswitch transcription regulation (Heppell et al., 2011). Our sm-FRET experiments showed that *yitJ* vector 1-3 U107C mutant behaves exactly like the WT in Mg^{2+} condition (fig. 3b). Indeed, fast transition between F_{Mg} and F_{NS} are observed with magnesium addition (Supplementary fig. S1c) but the stabilization of the F_{NS} state in SAM condition did not occur. This result suggests that the rotation of P1 stem is still detected in Mg^{2+} condition with the P3 ligand binding mutant. Previous CGE experiments of U107C mutant showed no difference in electrophoretic profile migration in Mg^{2+} condition for this mutant compared to the WT (Heppell et al., 2011), which fit to our data. Moreover, *fn02* vector 1-3 U107C mutant has also a high F_{NS} FRET population similar as the *fn02* WT in low $MgCl_2$ concentration (fig. 4b). This shows that the F_{NS} formation is strictly magnesium dependent in the case of the three-way junction aptamer *fn02*.

Interaction between P1 stem and its rotation

The sulfonium moiety of SAM ligand interacts with the minor groove of the P1 helix through Van Der Waals interactions (Montange and Batey, 2006). This electrostatic mechanism implicates the two carbonyl oxygens of the two universally conserved A-U base pairs of P1 stem with the charged sulfonium ion of SAM, which permit the discrimination of SAM over SAH by 550-fold (Boyapati et al., 2012). Batey group investigated several mutations in these two base pairs located in the P1 stem which impair the interaction between the sulfonium moiety of SAM. It causes a diminution of SAM

affinity and lowers the discrimination between SAM and SAH, depending of the nature of the nucleotide mutation.

We hypothesized that ligand interaction with the P1 stem caused the stabilization of the helical rotation (Heppell et al., 2011). A mutation located in the P1 stem has been inserted to test if it prevents the helical stem rotation stabilization. The P1 ligand-binding mutation A34U/U35A/U141A/A142U has been tested earlier by Batey group with isothermal calorimetry titration (ITC) and shows a 16 fold drop in affinity for SAM, which corresponds to a partial loss of interaction with the P1 stem (Montange et al., 2010). We observed that the ratio of F_{NS}/F_{Mg} FRET population for the *yitJ* vector 1-3 P1 mutant (fig. 3c) is lower than the WT at 3mM $MgCl_2$ and 1 μ M SAM, which shows that the P1 mutant has less affinity for SAM than the WT. To further test the relationship between the P1 stem and the sulfonium ion of SAM, we conducted sm-FRET experiments with a SAM analog, S-adenosylhomocysteine (SAH) that lacks the sulfonium moiety. However, an increased FRET value (~ 0.57) is obtained for the SAH condition compared to the WT (~ 0.47) for the F_{Mg} state (figure 3d) but we observed the ~ 0.75 FRET value corresponding to the F_{NS} state upon SAH binding. This result maintains the fact that the interaction between the ligand and P1 is not necessary for helical twist of P1 stem.

Conserved core base-pair mutation accentuates ion-dependent P1 rotation

Sequence alignments of SAM-I riboswitch shows that there is a base-pair in the core of the aptamer between the nucleotide U114 of the junction 3/4 and the nucleotide A138 of the junction 1/4 that is found in about 90% of the SAM-I variants, which suggest that it is an important structural element for the function of the riboswitch (Weinberg et al., 2008). The crystal structure also shows a base pairing between those two nucleotides (Montange and Batey, 2006). The mutant of the uracil in position 114 for an adenine or adenine in position A138 for an uracil has been shown to reduce the *yitJ* aptamer ligand affinity and *MetI* transcriptional activity (unpublished data). Our sm-FRET experiment shows that U114A

mutant in J3/4 has a higher F_{NS} contribution than WT in Mg^{2+} condition but does not display F_{NS} FRET population induction with SAM ligand addition (fig. 3e). The mutant A138U seems to behave exactly like the WT, which shows that the nature of the nucleotide is important for the effect of base pair mutation on ligand affinity (fig. 3f). Altogether, these results state that disruption of the core base pair at position U114 locks the aptamer in the twisted conformation in Mg^{2+} condition. We have further analyzed the core base pair mutant of the *fn02* aptamer at single-molecule level (fig. 4c and 4d). There is not seemed to be any difference between the two mutants. Indeed, their F_{NS} FRET populations are already high as seen as the WT in Mg^{2+} condition.

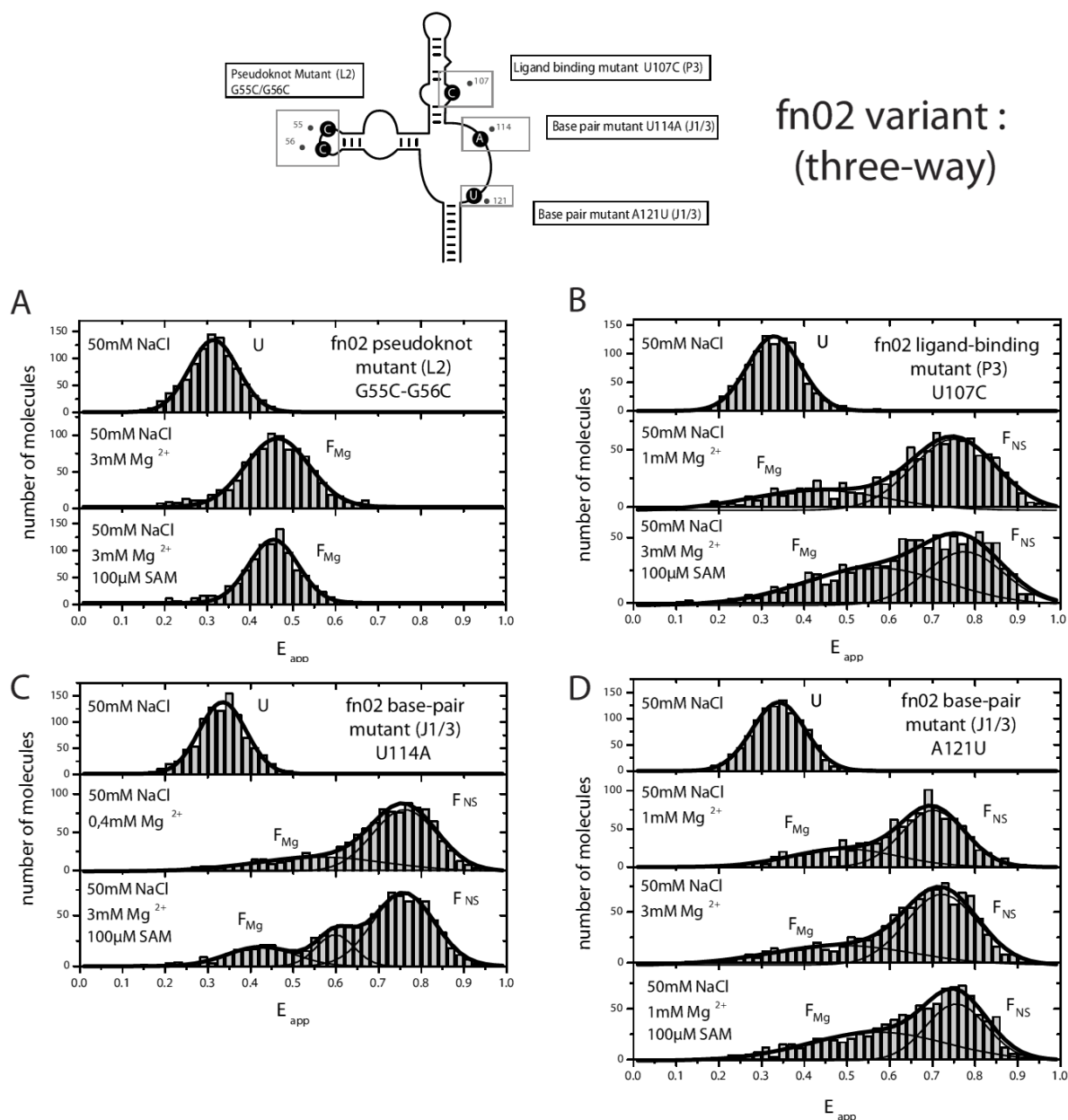


Figure 2.5: Single-molecule FRET analysis of the P1-P3 folding transition of *fn02* mutants with vector 1-3. The different mutant's sites are shown on the top of the histograms. Single-molecule histograms of FRET efficiency of *yitJ* pseudoknot mutant (A), P3 ligand-binding mutant (B), J1/3 base-pair mutant U114A and J1/3 base-pair mutant A121U (E) as a function of magnesium and SAM concentration are shown. All FRET efficiencies are the same value for the U state, F_{Mg} state and F_{NS} state as the WT.

Magnesium induction of aptamer core folding

To further evaluate the conformational changes induced by magnesium or SAM, 2-aminopurine (2AP), a fluorescent analog of adenine, has been incorporated at the position 110 in junction 1-4 of the four-way junction (which corresponds to A138 of the fluorescent aptamer used for sm-FRET) (Fig. 5a). 2AP fluorescence is known to be a very sensitive reporter of structural rearrangements in the local environment surrounding the fluorescent probe, as those likely to occur during the stacking process. Fluorescence intensity of incorporated 2AP is maximal in the unbound state and decrease upon formation of aptamer-ligand complex. It is indicating that 2AP at position 110 monitor P1-P4 stacking unit formation upon ligand binding. 2AP is quenched with addition of magnesium in presence of a saturated concentration of SAM (Fig. 5b). In fact, aptamer folds with magnesium allowing the ligand binding site formation and thus ligand binding capacity. The same experiment is performed with *fn02*, where an adenine has been replaced by a 2AP at position 76 (fig. 5a). The structural reorganization induced by SAM and magnesium is exactly the same for both *fn02* and *yitJ* (fig 5b). To address the role of each factor in the folding of the core, the structural change induced by magnesium and ligand has been studied separately. *yitJ* titrated by magnesium in absence of SAM ligand background reveals that no core folding occurs (fig 5c). However, in the same conditions, 2AP quenching is observed for *fn02* suggesting implication of magnesium in the core folding. *fn02*-2AP quenching is similar upon magnesium titration with and without SAM suggesting that core reorganization is SAM independent. Surprisingly, the pseudoknot is not essential for magnesium induced core pre-folding in *fn02* (Supplementary Fig. S2). Magnesium titration performed in absence of SAM background reveals that the 2AP quenching in *fn02*-P2 mutant is similar to the *fn02* wild-type (see Supplementary Figure S2). This indicates that the core reorganization induced by magnesium ions could be possible in the absence of the pseudoknot. It also reveals that the quenching of the wild-type *fn02* is not a monitoring of the pseudoknot formation but only the junction reorganization, which could come from the flexibility of the single-stranded regions. Mutations G27C/G28C has also been done in

yitJ variant. As expected, 2AP of *yitJ*-P2 is not responsive to magnesium ions (Supplementary fig. S2). The implication of SAM ligand in the core folding is achieved by a SAM titration in presence of 10 mM magnesium. A variation of 80% of the 2AP fluorescence is observed upon SAM binding for the *yitJ* variant (fig. 5d). This is explained by the SAM dependent formation of the P1-P4 helical stacking unit as shown previously (Heppell et al., 2011). In comparison, the 2AP is quenched at 20% for *fn02* but not quenched at all for the P2 mutant (fig 5d). Using those curves, $K_{d_{app}}$ have been determined using a two states model fitting. The $K_{d_{app}}$ for the SAM binding is 5 nM for *yitJ* and 50 times higher for *fn02* which has a $K_{d_{app}}$ of 270 nM (Figure 5d). Those results indicate that together, magnesium and SAM allow the aptamer to reach the same native conformation for both variants. However, the magnesium is the main folding modulator for the three-way junction and the SAM is the main modulator for the four-way junction. Study of the *fn02* variant contributes to suggest new evidences for a core folding events dependent of the magnesium but independent of the pseudoknot. This event not seems to exist in the context of *yitJ*.

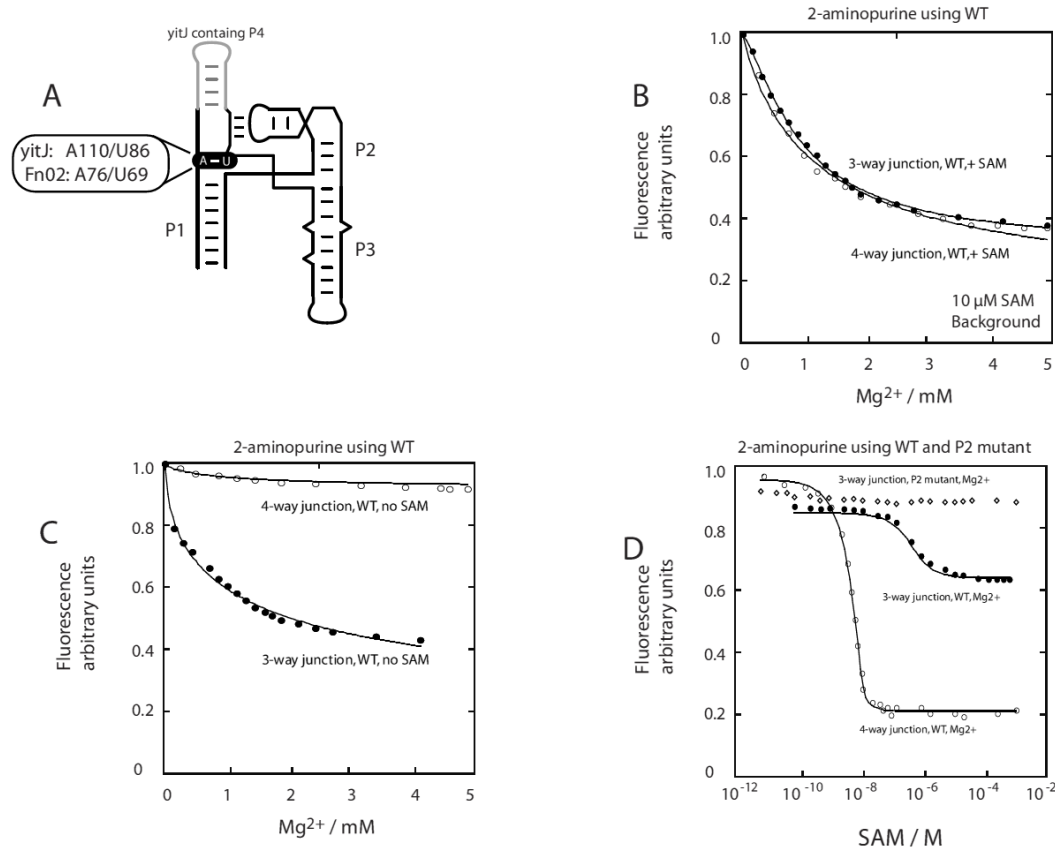


Figure 2.6: Presence of P4 stem affects the core aptamer folding. (A) Secondary structure schematic of the SAM aptamer domain showing the location of 2-aminopurine (2AP) fluorophores. A110 in *yitJ* variant and A76 in *fn02* variant, positioned upstream of P1 stem were replaced by 2AP to monitor the local structure the base pair. P4 stem is shown in gray and it is present only in the *yitJ* variant. (B-C) Folding of the riboswitch aptamer as a function of magnesium ion concentration. Conformational transitions were studied by the normalized change of 2AP fluorescence in the presence of 10 μ M SAM (B) and 0 μ M SAM (C) for *fn02* three-way junction (black circle) and *yitJ* four-way junction (open circle). Experimental data were fitted in each case by regression to a simple two-state model where the binding of metal ions to the aptamer induces a structural change. SAM binding is dependent of pseudoknot formation. (D) Normalized 2AP fluorescence intensity plotted as a function of ligand concentration. Changes of fluorescence were normalized to the maximum fluorescence measured in the absence of ligand. Ligand titrations were

performed for the three-way junction *fn02* (black circle), four-way junction *yitJ* (open circles) and three-way junction with a pseudoknot disrupted (open diamond). Lines show the best fit to a binding model.

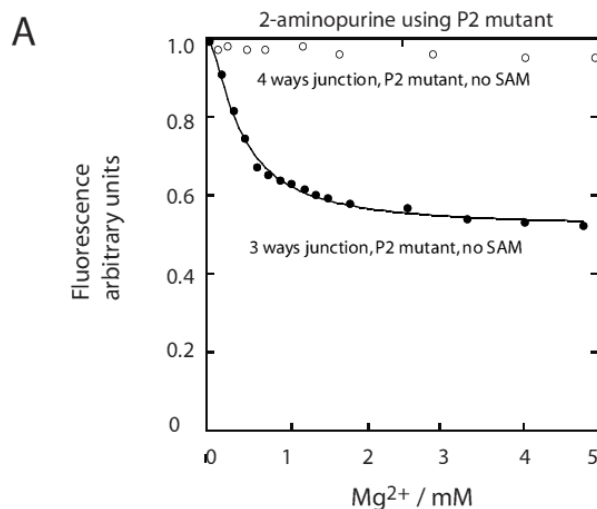


Figure 2.7 (Supplementary figure S2): SAM binding is dependent of pseudoknot formation. (A) Normalized 2AP fluorescence intensity plotted as a function of ligand concentration. Changes of fluorescence were normalized to the maximum fluorescence measured in the absence of ligand. Ligand titrations were performed for the three-way junction *fn02* (black circle), four-way junction *yitJ* (open circles) and three-way junction with a pseudoknot disrupted (open diamond). Lines show the best fits to a binding model.

2.6 Discussion

We previously showed the importance of the presence of the non-conserved P4 stem, which favors ligand recognition and riboswitch transcriptional activity (Heppell et al., 2011). It was also proposed that the P1-P4 stacking-unit formation, promoted by SAM binding, reorganized the P1-P3 close juxtaposition followed by a twist in P1 stem and thus favors the ligand-RNA complex stability. However, there was no evidence about the structural mechanisms of the implication of the P4 stem in the riboswitch folding. In this work, it was

shown that the absence of P4 stem in the *fn02* SAM-I aptamer locks the aptamer into a rotated conformation of the P1 stem, which is stabilized by Mg^{2+} as seen by sm-FRET experiments. A study that suggested a folding mechanism of a magnesium dependent ‘scissoring’ between P1 and P3 stem could also explain the way P1 and P3 close juxtaposition can confine the aptamer’s core (Hennelly and Sanbonmatsu, 2011). In the case of the three-way junction, the higher flexibility of single-stranded regions in the core could restrain the accessibility of the ligand by a closed conformation of the aptamer. Also, it was proposed that the absence of the P4 stem perturbs the ligand-binding site, which reduce the ligand affinity of the aptamer, which fits to our data (Heppell et al., 2011).

Mutagenesis of the SAM-I aptamer helped to give information of what is important for each folding step, which can be monitored by sm-FRET. The most interesting mutant of this paper is the U114A core base-pair mutant of the four-way junction *yitJ* aptamer that destabilizes the (U114-A138)-A52 which is important for the P1-P4 helical stacking. U114A mutant, in addition with the three-way junction that does not contain the P4 stem, demonstrated that the stacking of P1-P4 stems is not the cause of the P1 twist. Also, it exhibited the same behavior as the WT of the three-way junction *fn02* aptamer, which both of their F_{NS} states are highly stabilized upon Mg^{2+} binding. We did single-round with the *metI* U114A mutant of *Bacillus subtilis* which showed a diminution in riboswitch transcriptional termination (data not shown). The opposite base-pair core mutant A138U displayed no difference in transcription termination compared with the WT, which fits with our sm-FRET experiments. However, A138U has been tested by Lu et al. with the *yitJ* aptamer and does not show any difference transcription termination in single-round transcription assay compared to the WT. This could be possible because our RNA constructions are not identical. The kink-turn, which participates in the pseudoknot formation of SAM-I aptamer, has been shown to be stabilized by long ranged tertiary interactions such as a terminal loop interaction involving the pseudoknot (Schroeder et al., 2011). The pseudoknot mutant, which impairs this terminal loop interaction, completely disrupts the riboswitch structure (Heppell and Lafontaine, 2008). Our sm-FRET experiments showed that the lack of pseudoknot hinders the P1 rotation of the *yitJ* aptamer

and blocked fast transitions between U and F_{Mg} , which normally can be seen with the WT in Mg^{2+} condition. Therefore, the intermediate state formation, dependent of the pseudoknot, is necessary for ligand recognition. The P3 ligand-binding mutant U107C of *yitJ* aptamer showed fast transition between F_{Mg} and F_{NS} as the WT, which maintain the fact that an ion-induced rotation of P1 can be detected. However, the stabilization of F_{NS} upon ligand binding was not observed as the WT, which was predicted to happen since the ligand cannot bind to the P3 mutant aptamer. Sm-FRET assays with the P1 binding mutant of *yitJ* aptamer and SAH experiment with the WT aptamer validated that the interaction of P1 with the ligand is not necessary for the rotation of the P1 stem. The probable cause of the P1 rotation could come from the movement of the flexible regions J1/4 and J3/4 while the aptamer's core folding occurs. A group reported two statements concerning the folding of the aptamer's core. First, Mg^{2+} folds the aptamer into a compact structure almost similar to the native state, which structure is quite different than the unfolded state. Secondly, the core aptamer is in a more compact structure complexed with the ligand (as our F_{NS} state) than the Mg^{2+} alone (as our F_{Mg} state) (Baird and Ferré-D'Amaré, 2010). Altogether, this fits to our data which supports that the F_{NS} is still observed with fast transition between F_{Mg} and F_{NS} in Mg^{2+} condition, but stabilized upon ligand-binding.

The role of P4 as a core-scaffold element has been addressed. 2-aminopurine experiments performed on the three-way and the four-way junctions show that magnesium and SAM together promotes the same structural reorganization of the aptamer. However, when the 2AP quenching is analyzed separately for magnesium or SAM, it is observed that magnesium promotes major structural change in the three-way junction in absence of SAM. Despite the importance of the pseudoknot in SAM recognition, the magnesium-induced core-reorganization in the three-way junction is pseudoknot independent, which could be explained mainly because of the flexible regions of the J1/3 that does not interfere with the pseudoknot. This suggests that P4 stem is a core-scaffold element that can be replaced by magnesium in the aptamer lacking P4. This also supports the previously published SHAPE assays showing that magnesium and P4 stem play the role of core-scaffold element in

three-way and four-way junctions respectively (Heppell et al., 2011). Both variants fold in a two-step folding process: magnesium and a SAM binding step. The three-way junction has two simultaneous events in the magnesium step: firstly, a pre-folding event dependent of the pseudoknot and necessary for SAM binding and secondly, the core folding event independent of the pseudoknot. The latter conformational change is still unclear because we still don't know the link between the partial folding of the core and the P1 rotation blocking of *fn02* pseudoknot mutant in Mg^{2+} condition. However, SAM induced a discrete folding step of the three-way junction upon binding compared to the four-way junction. In comparison, the four-way junction has two separate events: firstly, a magnesium step dependant of the pseudoknot in which the aptamer prefolds, and secondly, the SAM step where the junction 1-4 reorganizes upon addition of SAM due to P1-P4 stacking unit formation. The prefolding of the core is done by the presence of P4 without magnesium as shown by published SHAPE (Heppell et al., 2011).

Moreover, this result indicates that the absence of P4 stem changes the general type of riboswitch operation. Effectively, Montange and Batey have proposed a classification system in which riboswitches are grouped in two types (Roth and Breaker, 2009). Aptamers that are modestly reorganized upon ligand binding are referred to as type I. Those for which the ligand induces large and global structural conformational change are classified as type II. In the case of the four-way junction, 2-aminopurine experiments and FRET show that SAM induces large reorganization of the structure since the P4 stem stacks to form the P1-P4 stacking unit. The four-way junction is then referred as a type-II riboswitch. As shown by 2-aminopurine, the same region of the three-way junction context is partially reorganized with addition of SAM indicating that the SAM-I lacking the P4 stem works more like a type I riboswitch.

Overall, our results show some insights on the unique twist that happens in the SAM-I riboswitch and the relationship between the three-way and four-way aptamer with the core folding. It could be interesting to extend our work with *in vivo* studies to check if the twist

is observable in a cellular context. However, sm-FRET, which is still a powerful technique to study RNA dynamics with synthetic oligonucleotides, has its own limitations. The eventual labelling chemistry of RNA will probably help to investigate native functional transcriptional complexes during elongation of nascent riboswitches in a real-time manner.

2.7 Acknowledgment

The authors thank members of the Lafontaine's laboratory and Penedo's laboratory.

2.8 Funding

National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC); Canadian Institute for Health Research (CIHR) New Investigator scholar (to D.A.L.); Funding for open access charge: NSERC.

Conflict of interest statement. None declared.

2.9 References

- Baird, N.J., and Ferré-D'Amaré, A.R. (2010). Idiosyncratically tuned switching behavior of riboswitch aptamer domains revealed by comparative small-angle X-ray scattering analysis. *RNA* 16, 598–609.
- Blount, K.F., and Breaker, R.R. (2006). Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat. Biotechnol.* 24, 1558–1564.
- Blount, K.F., Wang, J.X., Lim, J., Sudarsan, N., and Breaker, R.R. (2007). Antibacterial lysine analogs that target lysine riboswitches. *Nat. Chem. Biol.* 3, 44–49.
- Boudreault, J., Perez-Gonzalez, D.C., Penedo, C. and Lafontaine, D.A. (2015). Single-Molecule Approaches for the Characterization of Riboswitch Folding Mechanisms. *Methods in Molecular Biology: DNA-Protein Interactions, Principles and Protocols.*, 101–107.

Boyapati, V.K., Huang, W., Spedale, J., and Aboul-ela, F. (2012). Basis for ligand discrimination between ON and OFF state riboswitch conformations: The case of the SAM-I riboswitch. *RNA* *18*, 1230–1243.

Breaker, R.R. (2012). Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a003566

Brenner, M.D., Scanlan, M.S., Nahas, M.K., Ha, T., and Silverman, S.K. (2010). Multivector Fluorescence Analysis of the *xpt* Guanine Riboswitch Aptamer Domain and the Conformational Role of Guanine. *Biochemistry* *49*, 1596–1605.

Caron, M.-P., Bastet, L., Lussier, A., Simoneau-Roy, M., Massé, E., and Lafontaine, D.A. (2012). Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E3444–E3453.

Epshtein, V., Mironov, A.S., and Nudler, E. (2003). The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5052–5056.

Hennelly, S.P., and Sanbonmatsu, K.Y. (2011). Tertiary contacts control switching of the SAM-I riboswitch. *Nucleic Acids Res.* *39*, 2416–2431.

Heppell, B., and Lafontaine, D.A. (2008). Folding of the SAM aptamer is determined by the formation of a K-turn-dependent pseudoknot. *Biochemistry* *47*, 1490–1499.

Heppell, B., Blouin, S., Dussault, A.-M., Mulhbach, J., Ennifar, E., Penedo, J.C., and Lafontaine, D.A. (2011). Molecular insights into the ligand-controlled organization of the SAM-I riboswitch. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 384–392.

Kubodera, T., Watanabe, M., Yoshiuchi, K., Yamashita, N., Nishimura, A., Nakai, S., Gomi, K., and Hanamoto, H. (2003). Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* *thiA* requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett.* *555*, 516–520.

Lilley, D.M.J. (2014). The K-turn motif in riboswitches and other RNA species. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* *1839*, 995–1004.

Loh, E., Dussurget, O., Gripenland, J., Vaitkevicius, K., Tiensuu, T., Mandin, P., Repoila, F., Buchrieser, C., Cossart, P., and Johansson, J. (2009). A trans-Acting Riboswitch Controls Expression of the Virulence Regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* *139*,

770–779.

Lu, C., Ding, F., Chowdhury, A., Pradhan, V., Tomsic, J., Holmes, W.M., Henkin, T.M., and Ke, A. (2010). SAM Recognition and Conformational Switching Mechanism in the *Bacillus subtilis* yitJ S Box/SAM-I Riboswitch. *J. Mol. Biol.* *404*, 803–818.

Lucks, J.B., Qi, L., Whitaker, W.R., and Arkin, A.P. (2008). Toward scalable parts families for predictable design of biological circuits. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 567–573.

Lucks, J.B., Qi, L., Mutalik, V.K., Wang, D., and Arkin, A.P. (2011). Versatile RNA-sensing transcriptional regulators for engineering genetic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 8617–8622.

Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., and Uhlenbeck, O.C. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* *15*, 8783–8798.

Montange, R.K., and Batey, R.T. (2006). Structure of the S-adenosylmethionine riboswitch regulatory mRNA element. *Nature* *441*, 1172–1175.

Montange, R.K., Mondragón, E., van Tyne, D., Garst, A.D., Ceres, P., and Batey, R.T. (2010). Discrimination between Closely Related Cellular Metabolites by the SAM-I Riboswitch. *J. Mol. Biol.* *396*, 761–772.

Price, I.R., Grigg, J.C., and Ke, A. (2014). Common themes and differences in SAM recognition among SAM riboswitches. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* *1839*, 931–938.

Robert T. Batey (2011). Recognition of S-adenosylmethionine by riboswitches. *Wiley Interdiscip Rev RNA* *2*, 299–311.

Roth, A., and Breaker, R.R. (2009). The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 305–334.

Schroeder, K.T., Daldrop, P., and Lilley, D.M.J. (2011). RNA tertiary interactions in a riboswitch stabilize the structure of a kink turn. *Structure* *19*, 1233–1240.

Serganov, A., and Nudler, E. (2013). A decade of riboswitches. *Cell* *152*, 17–24.

Stoddard, C.D., Montange, R.K., Hennelly, S.P., Rambo, R.P., Sanbonmatsu, K.Y., and

Batey, R.T. (2010). Free State Conformational Sampling of the SAM-I Riboswitch Aptamer Domain. *Structure* *18*, 787–797.

Trausch, J.J., Xu, Z., Edwards, A.L., Reyes, F.E., Ross, P.E., Knight, R., and Batey, R.T. (2014). Structural basis for diversity in the SAM clan of riboswitches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 6624–6629.

Wang, J.X., Elaine R., Dianali Rivera Morales, and Lim, J. (2008). Riboswitches that Sense S-adenosylhomocysteine and Activate Genes Involved in Coenzyme Recycling. *Mol Cell.* *29*, 691–702.

Weinberg, Z., Regulski, E.E., Hammond, M.C., Barrick, J.E., Yao, Z., Ruzzo, W.L., and Breaker, R.R. (2008). The aptamer core of SAM-IV riboswitches mimics the ligand-binding site of SAM-I riboswitches. *RNA* *14*, 822–828.

Winkler, W., Nahvi, A., and Breaker, R.R. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* *419*, 952–956.

Winkler, W.C., Nahvi, A., Sudarsan, N., Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2003). An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 701–707.

Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J. a, and Breaker, R.R. (2004). Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* *428*, 281–286.

CHAPITRE 3

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

3.1. Discussion générale

L'étude du repliement des riborégulateurs est un sujet biomoléculaire complexe impliquant deux structures en compétition sur le même ARNm. La compétition des deux macro-domaines d'ARN implique l'interaction de différents facteurs complexes et spécifiques tels que la liaison d'ions métalliques et de ligand ainsi que des interactions électrostatiques. La caractérisation structurale des riborégulateurs demande une batterie de techniques et d'expérimentations pour en aboutir à un modèle concluant pouvant se rapprocher de ce qui se passe réellement dans la cellule. Cet article s'est principalement penché sur la relation qui existe entre le repliement de l'ARN, étudié en temps réel grâce au sm-FRET, et les nucléotides clés qui entrent en contact avec le ligand. Cette approche a permis de mieux comprendre l'interaction entre les groupements chimiques de SAM et les nucléotides de l'aptamère SAM-I *yitJ*, possédant quatre tiges-boucles (P1-P4). Cet aptamère a été comparé avec un autre membre de la même famille SAM-I, *fn02*, possédant trois voies. En effet, il a été démontré que les 11 riborégulateurs différents de SAM chez *Bacillus subtilis* possèdent une grande variabilité naturelle en ce qui concerne leur affinité pour le ligand (Tomšič et al., 2008). Lorsqu'une carence de méthionine survient dans la bactérie, les premiers gènes activés sont les transporteurs de la méthionine. Lorsque la carence est encore plus prononcée, la bactérie active sa voie de synthèse de la méthionine. Notre laboratoire a

également démontré que l'affinité pour le ligand varie en fonction de la tige variable P4 (Heppell et al., 2011).

Nous avons montré une différence claire entre l'aptamère *fn02* (3 voies) et *yitJ* (4 voies) au niveau de la dynamique de leur repliement, particulièrement au niveau de la rotation de la tige P1. Le vecteur 1-3, contenant la paire de fluorophores Cy3 et Cy5 situé respectivement sur la tige P1 et P3, a permis de détecter spécifiquement des changements de FRET correspondant à cette rotation qui a été préalablement validée grâce à la technique de CGE par notre laboratoire pour l'aptamère *yitJ* et *fn02* (données non-montrées). Cependant, il est à noter que cette rotation n'est pas détectable par CGE à des concentrations élevées de magnésium, car aucune différence de migration n'avait été observée (données non-montrées). D'ailleurs, c'est pour cette raison que le sm-FRET est la technique de choix qui a été utilisée pour caractériser l'état intermédiaire F_{Mg} , qui est dans ce cas la rotation de P1 Mg^{2+} dépendante. Pour la première fois, une rotation induite par un ion métallique et un ligand a été comparée avec un variant génétique de la même famille possédant des caractéristiques structurales distinctes, dans le cas présent, l'absence de la tige P4 non conservée. Nous avons démontré que le magnésium joue un rôle important dans le repliement de l'aptamère à trois voies *fn02*. La cause probable de l'affinité plus faible de *fn02* pourrait être l'adoption d'une conformation « fermée » du cœur de l'aptamère correspondant au F_{NS} . Cette conformation diminuerait la probabilité que le ligand se lie à l'aptamère étant donné que la poche de liaison dans le cœur est moins accessible. Nos essais de fluorescence avec la 2-aminopurine démontrent également une compaction du cœur pour *fn02* en condition de Mg^{2+} comparativement à *yitJ*. Un plus grand changement de fluorescence a été observé pour *fn02*, ce qui correspond à un réarrangement de la structure globale qui est Mg^{2+} dépendant contrairement à *yitJ* qui est SAM dépendant.

Il est à noter que l'empilement hélicoïdal entre la tige P1 et P4, stabilisé par la liaison du ligand, ne peut pas avoir lieu dans le cas de *fn02*. Concernant l'empilement hélicoïdal, il existe également une paire de base située dans le cœur à la position U114-A138 qui

participe à sa formation. Sa structure a été mise en évidence grâce à sa résolution par cristallographie aux rayons X (Gilbert et al., 2006). La mutation de cette paire de base essentielle empêche également l'empilement hélicoïdal de P1 et P4 et diminue l'affinité pour le ligand. Les résultats de sm-FRET démontrent que l'aptamère *fn02* sauvage et le *yitJ* mutant U114A possèdent le même dynamisme au niveau de la rotation de P1, qui est fortement stabilisée. Ce résultat soutient l'hypothèse que l'empêchement de l'empilement hélicoïdal en condition de magnésium ajouterait de la flexibilité au cœur et permettrait à la tige P1 d'entrer en rotation plus facilement. Il en serait de même pour l'aptamère à trois voies, à qui le cœur flexible rend la P1 plus libre d'effectuer une rotation.

Plusieurs études antérieures ont permis de caractériser la structure des riborégulateurs à différents niveaux, telles que la cartographie chimique (*in-line probing*), la cristallographie à rayon X, la spectroscopie de résonance de type nucléaire (RMN) et le transfert d'énergie de type Förster. D'autres études ont aussi démontré différentes implications au niveau du changement de fonction du riborégulateur au niveau de la transcription, ce qui permet d'établir une relation entre la structure et la fonction. Par exemple, les transcriptions à cycle unique permettent de comparer les changements de pourcentage de terminaison de transcription des mutants par rapport au type sauvage *in vitro*. Le mutant du pseudonoeud G55C-G56C ainsi que le mutant de liaison de la tige P3 U107C sont les mutants ayant le plus d'impact sur l'empêchement de la terminaison de la transcription (Heppell et al., 2011). L'absence du changement structural de l'aptamère normalement causée par la liaison du ligand empêche la formation de la tige terminatrice de transcription, ce qui fait en sorte que le riborégulateur reste sous sa forme active. Toutefois, ces deux différentes mutations, inhibant toutes deux l'activité du riborégulateur, n'ont pas le même mécanisme d'action. En effet, les diagrammes de populations de sm-FRET obtenus ont démontré que le pseudonoeud déstabilise la structure globale de l'aptamère, l'empêchant d'opter pour une structure de préorganisation du site de liaison du ligand. Cette structure de préorganisation du site de liaison du ligand est aussi appelé l'état intermédiaire ou F_{Mg} . En ce qui concerne le mutant de la P3, il empêche une interaction entre l'uracile de l'aptamère en position 107

avec le groupement adénosine de SAM. Dans l'article de ce mémoire, nous avons également montré que le mutant U107C effectue des transitions entre l'état conformationnel intermédiaire F_{Mg} et l'état natif F_{NS} , ce qui démontre que la structure globale de l'aptamère n'est pas affectée. Bref, ces deux mutants ne peuvent pas lier le ligand, mais agissent très différemment au niveau de la structure globale de l'aptamère, ce qui affecte la liaison du ligand.

L'activité transcriptionnelle des gènes peut également se mesurer *in vivo*. Un exemple de technique permettant de comparer les taux de terminaison de transcription du riborégulateur SAM-I *in vivo* est le test de β -galactosidase avec gène rapporteur (fig. 3.14) (McDaniel et al., 2003). Cette technique nécessite la construction d'une fusion transcriptionnelle constituée du gène d'intérêt possédant son riborégulateur qui contrôle son expression génétique et son propre site de liaison du ribosome (RBS) ainsi qu'un gène rapporteur *lacZ* possédant également son propre RBS. Il y aura un ARN messenger contenant l'information de deux protéines (gène X et LacZ) qui seront traduites indépendamment. Par contre, le riborégulateur situé en amont du gène X, contrôle la transcription de la totalité de l'ARNm en fonction de l'activité du riborégulateur reliée à la concentration de ligand (voir fig. 3.14). L'activité transcriptionnelle *in vitro* entre un ARNm contenant la fusion transcriptionnelle est mesurée par l'ajout d'un substrat, l'ONPG (ortho-nitrophényl- β -galactoside) qui devient coloré lorsqu'il est hydrolysé par l'enzyme β -galactosidase. Ensuite, les différents taux de transcription sont comparés avec un contrôle sans riborégulateur et/ou d'autres mutants affectant l'activité du riborégulateur. L'ajout de SAM dans les essais de β -galactosidase avec gène rapporteur réprime l'expression génétique des gènes en aval du riborégulateur. Il serait intéressant de pouvoir étudier le repliement de riborégulateurs *in vivo*, ce qui n'a jamais été fait jusqu'à maintenant. En effet, la prochaine étape serait d'étudier un ARN en cours de transcription, soit dans un contexte natif où la polymérase pourrait intégrer des nucléotides synthétiques dans la séquence de l'ARNm, qui pourront être marqués avec des fluorophores afin de mesurer le FRET en temps réel durant la transcription par sm-FRET.

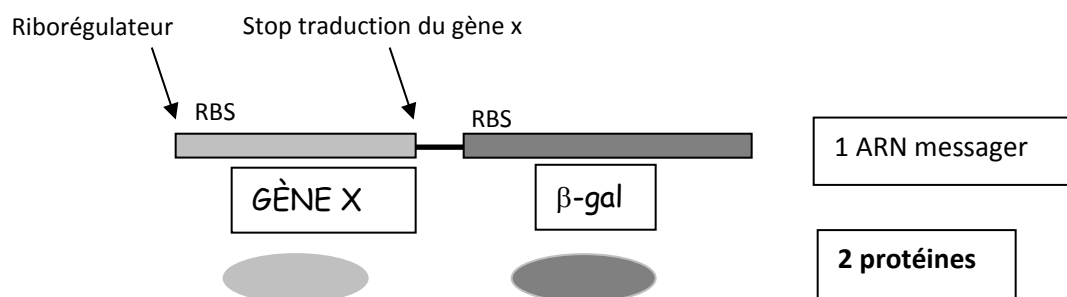


Figure 3.1 : Fusion transcriptionnelle d'un gène X avec celui de la β -galactosidase. Ils ont leurs propres de site de liaison au ribosome. L'activité transcriptionnelle des gènes fusionnés est mesurée.

3.2 Conclusion

L'objectif principal de mon projet de maîtrise était de caractériser la structure et de déterminer la dynamique de changements conformationnels du riborégulateur SAM-I à l'aide de la technique de sm-FRET. Plusieurs mutants qui bloquent différentes étapes dans le repliement de l'aptamère ont été testés en temps réel. La majorité des expérimentations effectuées au cours de ma maîtrise est basée sur l'article de Benoît Heppell et ses collaborateurs publié en 2011 dans la revue *Nature Chemical Biology* (Heppell et al., 2011). D'ailleurs, ce mémoire s'est penché principalement sur la caractérisation de l'état intermédiaire, qui a été une découverte importante présentée dans le chapitre 2 de ce mémoire. Le seul vecteur intéressant pour observer cet état intermédiaire en temps réel a été le vecteur 1-3, qui a permis d'observer la juxtaposition de P1 et P3 ainsi que la rotation de la tige P1, en condition de magnésium. L'objectif, qui était d'utiliser ce vecteur avec différents mutants, a été atteint, car beaucoup d'information structurale a été récoltée sur l'intermédiaire. Le vecteur 1-4 a été testé, mais aucune transition, correspondant aux

changements conformationnels, n'a été observée lors de son expérimentation par sm-FRET. Le vecteur 3-4 a également été testé, mais aucune valeur de FRET n'a été observée, car la distance entre les fluorophores était trop élevée. De ce fait, différents emplacements de la paire de fluorophore devront être testés sur le vecteur 3-4 afin d'optimiser les valeurs de FRET, ce qui permettra la détection des changements conformationnels.

Ce mémoire s'est penché également sur la rotation de la tige P1, qui est unique parmi tous les riborégulateurs jusqu'à maintenant. Un des buts de cet article était de récolter de l'information sur cette rotation, qui est détectable par sm-FRET grâce au facteur d'orientation FRET-dépendant du couple des fluorophores Cy3 et Cy5 (Iqbal et al., 2008). Les différentes mutations affectant la liaison du ligand ont démontré que la rotation de la tige P1 est provient de la flexibilité des régions simples brins du cœur et qu'elle est également dépendante du magnésium. Donc, l'objectif concernant la tige P1 a été atteint. Des expériences concernant la détermination du pas de l'hélice ainsi que le degré de rotation de la tige P1 ont été effectués au sm-FRET mais n'ont pas été insérés dans ce mémoire. La caractérisation de la phase ondulatoire a été testée en CGE par Anne-Marie Dussault qui est une étudiante graduée (2012) de notre laboratoire, ce qui donne de l'information sur la rotation de P1 (voir Annexe). En effet, il a été démontré grâce à la caractérisation de la périodicité de la rotation de la tige P1 d'un aptamère à 4 voies qu'elle s'effectue selon un pas droit à un angle d'environ 30°. Le même résultat a été obtenu avec les expériences de sm-FRET que j'ai effectuées (données non montrées). Cependant, des données sont encore manquantes pour confirmer ce résultat. Il serait d'avantage intéressant de pousser ce projet plus loin afin de finir la merveilleuse histoire du riborégulateur SAM-I, ce qui aiderait grandement à la compréhension de cette rotation unique parmi le monde de la biologie moléculaire.

ANNEXES

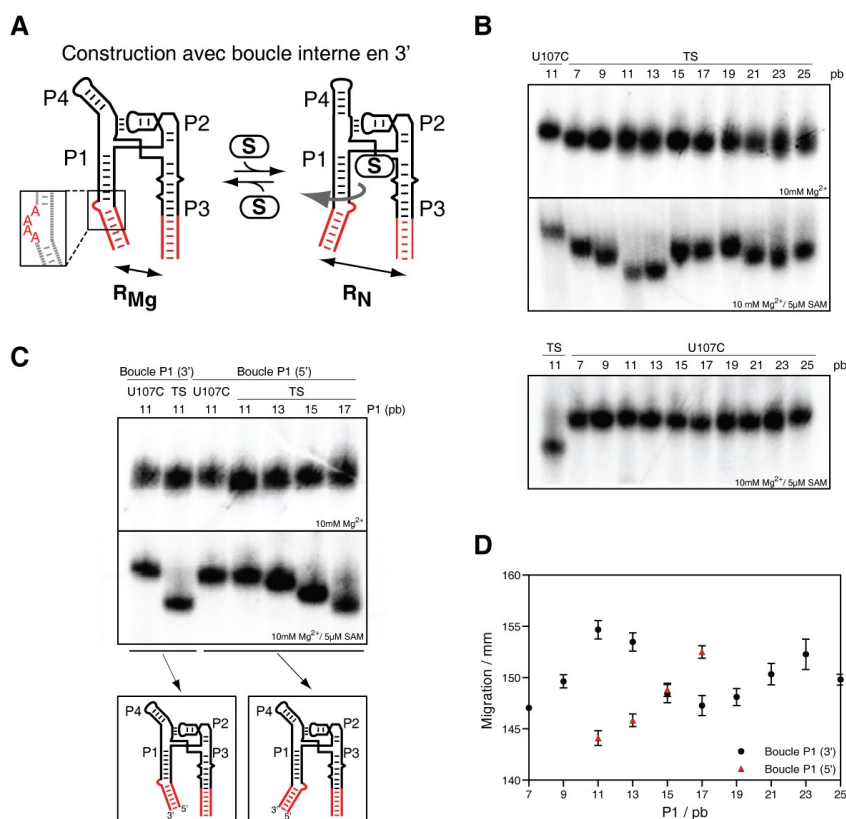


Figure A.1 Caractérisation de la phase ondulatoire de la rotation de la tige P1 par CGE. (Figure tiré du mémoire d'Anne-Marie Dussault)

(A) Construction CGE 1-3 permettant d'étudier sur gel l'angle entre les tiges P1 et P3 en absence et en présence de SAM. Allongement des tiges P1 et P3 d'environ 30 paires de bases aléatoires (rouge). Une boucle interne constituée de 4 adénines a été ajoutée sur le brin 3' ou 5' de la tige P1. Afin de caractériser la phase ondulatoire de la rotation de la tige P1, cette boucle interne (gris et rouge) a été déplacée vers l'extrémité de la tige. Modèle basé sur celui décrit par Heppell et al. (2011). (B) Électrophorèses comparatives sur gel (CGE) en absence (haut) ou en présence de SAM (centre) effectuée sur des vecteurs de type sauvage (TS) où la boucle interne

(en 3') a été déplacée le long de la tige P1. CGE effectuée sur l'aptamère mutant U107C en présence de SAM (bas). (C) CGE avec déplacement de la boucle interne (en 5') effectué avec des aptamères de type sauvage en absence (haut) ou en présence de SAM (bas). (D) Représentation graphique de la phase ondulatoire de la rotation de la tige P1.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott, J.A., Francklyn, C.S., and Robey-Bond, S.M. (2014). Transfer RNA and human disease. *Front. Genet.* 5, 158.

Baird, N.J., and Ferré-D'Amaré, A.R. (2010). Idiosyncratically tuned switching behavior of riboswitch aptamer domains revealed by comparative small-angle X-ray scattering analysis. *RNA* 16, 598–609.

Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2007). The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol.* 8, R239.

Blanchard, S.C., Kim, H.D., Gonzalez, R.L., Puglisi, J.D., and Chu, S. (2004). tRNA dynamics on the ribosome during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12893–12898.

Blount, K.F., and Breaker, R.R. (2006). Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat. Biotechnol.* 24, 1558–1564.

Blount, K.F., Wang, J.X., Lim, J., Sudarsan, N., and Breaker, R.R. (2007). Antibacterial lysine analogs that target lysine riboswitches. *Nat. Chem. Biol.* 3, 44–49.

Boudreault, J., Perez-Gonzalez, D.C., Penedo, C. and Lafontaine, D.A. (2015). Single-Molecule Approaches for the Characterization of Riboswitch Folding Mechanisms. *Methods in Molecular Biology: DNA-Protein Interactions, Principles and Protocols.*, pp. 101–107.

Boyapati, V.K., Huang, W., Spedale, J., and Aboul-ela, F. (2012). Basis for ligand discrimination between ON and OFF state riboswitch conformations: The case of the SAM-I riboswitch. *RNA* 18, 1230–1243.

Breaker, R.R. (2012). Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a003566.

Brenner, M.D., Scanlan, M.S., Nahas, M.K., Ha, T., and Silverman, S.K. (2010). Multivector Fluorescence Analysis of the *xpt* Guanine Riboswitch Aptamer Domain and the Conformational Role of Guanine. *Biochemistry* 49, 1596–1605.

Caron, M.-P., Bastet, L., Lussier, A., Simoneau-Roy, M., Massé, E., and Lafontaine, D.A. (2012). Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3444–3453.

Cheah, M.T., Wachter, A., Sudarsan, N., and Breaker, R.R. (2007). Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* *447*, 497–500.

Chen, J., Tsai, A., O’Leary, S.E., Petrov, A., and Puglisi, J.D. (2012). Unraveling the dynamics of ribosome translocation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *22*, 804–814.

Clegg, R.M. (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.* *6*, 103–110.

Deana, A., and Belasco, J.G. (2005). Lost in translation: The influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev.* *19*, 2526–2533.

Epshtein, V., Mironov, A.S., and Nudler, E. (2003). The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5052–5056.

Farnham, P.J., and Platt, T. (1981). Rho-independent termination: Dyad symmetry in DNA causes RNA polymerase to pause during transcription *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* *9*, 563–577.

Frank, J. (2012). Intermediate states during mRNA-tRNA translocation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *22*, 778–785.

Frank, J., and Agrawal, R.K. (2000). A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* *406*, 318–322.

Friedman, D.I., and Court, D.L. (1995). Transcription antitermination: the lambda paradigm updated. *Mol. Microbiol.* *18*, 191–200.

Fuchs, R.T., Grundy, F.J., and Henkin, T.M. (2006). The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 226–233.

Gilbert, S.D., Montange, R.K., Stoddard, C.D., and Batey, R.T. (2006). Structural studies of the purine and SAM binding riboswitches. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *71*,

259–268.

Goodenbour, J.M., and Pan, T. (2006). Diversity of tRNA genes in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* *34*, 6137–6146.

Grundy, F.J., and Henkin, T.M. (1998). The S box regulon: A new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* *30*, 737–749.

Gusarov, I., and Nudler, E. (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol. Cell* *3*, 495–504.

Hammond, M.C. (2011). RNA folding: a tale of two riboswitches. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 342–343.

Hennelly, S.P., and Sanbonmatsu, K.Y. (2011). Tertiary contacts control switching of the SAM-I riboswitch. *Nucleic Acids Res.* *39*, 2416–2431.

Heppell, B., and Lafontaine, D.A. (2008). Folding of the SAM aptamer is determined by the formation of a K-turn-dependent pseudoknot. *Biochemistry* *47*, 1490–1499.

Heppell, B., Blouin, S., Dussault, A.-M., Mulhbach, J., Ennifar, E., Penedo, J.C., and Lafontaine, D.A. (2011). Molecular insights into the ligand-controlled organization of the SAM-I riboswitch. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 384–392.

Hollands, K., Proshkin, S., Sklyarova, S., Epshtein, V., Mironov, A., Nudler, E., and Groisman, E.A. (2012). Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 5376–5381.

Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R., and Zamir, A. (1965). Structure of a ribonucleic acid. *Science* *147*, 1462–1465.

Hwang, L.C., Hohlbein, J., Holden, S.J., and Kapanidis, A.N. (2009). Single-molecule FRET : methods and biological applications. *Handbook of Single-Molecule Biophysics*. P. Hinterdorfer and A. van Oijen, eds. (New York: Springer US), pp. 129–163.

Iqbal, A., Arslan, S., Okumus, B., Wilson, T.J., Giraud, G., Norman, D.G., Ha, T., and Lilley, D.M.J. (2008). Orientation dependence in fluorescent energy transfer between Cy3 and Cy5 terminally attached to double-stranded nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11176–11181.

Jacob, F., and Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* *3*, 318–356.

Kazantsev, A. V, Krivenko, A. a, Harrington, D.J., Holbrook, S.R., Adams, P.D., and Pace, N.R. (2005). Crystal structure of a bacterial ribonuclease P RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* *102*, 13392–13397.

Kim, S.H., Sussman, J.L., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Wang, H., Seeman, N.C., and Rich, A. (1974). The general structure of transfer RNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *71*, 4970–4974.

Kubodera, T., Watanabe, M., Yoshiuchi, K., Yamashita, N., Nishimura, A., Nakai, S., Gomi, K., and Hanamoto, H. (2003). Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* thiA requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett.* *555*, 516–520.

Lilley, D.M.J. (2014). The K-turn motif in riboswitches and other RNA species. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* *1839*, 995–1004.

Loh, E., Dussurget, O., Gripenland, J., Vaitkevicius, K., Tiensuu, T., Mandin, P., Repoila, F., Buchrieser, C., Cossart, P., and Johansson, J. (2009). A trans-Acting Riboswitch Controls Expression of the Virulence Regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* *139*, 770–779.

Lu, C., Ding, F., Chowdhury, A., Pradhan, V., Tomsic, J., Holmes, W.M., Henkin, T.M., and Ke, A. (2010). SAM Recognition and Conformational Switching Mechanism in the *Bacillus subtilis* yitJ S Box/SAM-I Riboswitch. *J. Mol. Biol.* *404*, 803–818.

Lucks, J.B., Qi, L., Whitaker, W.R., and Arkin, A.P. (2008). Toward scalable parts families for predictable design of biological circuits. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 567–573.

Lucks, J.B., Qi, L., Mutalik, V.K., Wang, D., and Arkin, A.P. (2011). Versatile RNA-sensing transcriptional regulators for engineering genetic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 8617–8622.

McCown, P.J., Liang, J.J., Weinberg, Z., and Breaker, R.R. (2014). Structural, functional, and taxonomic diversity of three preq1 riboswitch classes. *Chem. Biol.* *21*, 880–889.

McDaniel, B.M., Grundy, F.J., Artsimovitch, I., and Henkin, T.M. (2003). Transcription

termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 3083–3088.

Meyer, M.M., Hammond, M.C., Salinas, Y., Roth, A., Sudarsan, N., and Breaker, R.R. (2011). Challenges of ligand identification for riboswitch candidates. *RNA Biol.* *8*, 5–10.

Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., and Uhlenbeck, O.C. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* *15*, 8783–8798.

Montange, R.K., and Batey, R.T. (2006). Structure of the S-adenosylmethionine riboswitch regulatory mRNA element. *Nature* *441*, 1172–1175.

Montange, R.K., Mondragón, E., van Tyne, D., Garst, A.D., Ceres, P., and Batey, R.T. (2010). Discrimination between Closely Related Cellular Metabolites by the SAM-I Riboswitch. *J. Mol. Biol.* *396*, 761–772.

Morita, M.T., Tanaka, Y., Kodama, T.S., Kyogoku, Y., Yanagi, H., and Yura, T. (1999). Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev.* *13*, 655–665.

Munro, J.B., Altman, R.B., O'Connor, N., and Blanchard, S.C. (2007). Identification of Two Distinct Hybrid State Intermediates on the Ribosome. *Mol. Cell* *25*, 505–517.

Nechooshtan, G., Elgrably-Weiss, M., Sheaffer, A., Westhof, E., and Altuvia, S. (2009). A pH-responsive riboregulator. *Genes Dev.* *23*, 2650–2662.

Pan, T., and Sosnick, T. (2006). Rna Folding During Transcription. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *35*, 161–175.

Price, I.R., Grigg, J.C., and Ke, A. (2014). Common themes and differences in SAM recognition among SAM riboswitches. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* *1839*, 931–938.

Proshkin, S., Mironov, A., and Nudler, E. (2014). Riboswitches in regulation of Rho-dependent transcription termination. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* *1839*, 974–977.

Rahul, R., Hohng, S., and Ha, T. (2008). A Practical Guide to Single Molecule FRET. *Nat. Methods* *5*, 507–516.

Ramesh, A., and Winkler, W.C. (2010). Magnesium-sensing riboswitches in bacteria. *RNA Biol.* 7, 77–83.

Robert T. Batey (2011). Recognition of S-adenosylmethionine by riboswitches. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 299–311.

Roth, A., and Breaker, R.R. (2009). The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 305–334.

Schaller, A., Desetty, R., Hahn, D., Jackson, C.B., Nuoffer, J.M., Gallati, S., and Levinger, L. (2011). Impairment of mitochondrial tRNA(Ile) processing by a novel mutation associated with chronic progressive external ophthalmoplegia. *Mitochondrion* 11, 488–496.

Schroeder, K.T., Daldrop, P., and Lilley, D.M.J. (2011). RNA tertiary interactions in a riboswitch stabilize the structure of a kink turn. *Structure* 19, 1233–1240.

Serganov, A., and Nudler, E. (2013). A decade of riboswitches. *Cell* 152, 17–24.

Shaw, E., and St-Pierre, P. (2014). Using sm-FRET and Denaturants to Reveal Folding Landscapes. *Methods in Enzymology* 549, 313–341.

Shi, H., and Moore, P.B. (2000). The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 1.93 Å resolution: a classic structure revisited. *RNA* 6, 1091–1105.

Sigler, P.B. (1975). An Analysis of the Structure of tRNA. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 4, 477–527.

Stoddard, C.D., Montange, R.K., Hennelly, S.P., Rambo, R.P., Sanbonmatsu, K.Y., and Batey, R.T. (2010). Free State Conformational Sampling of the SAM-I Riboswitch Aptamer Domain. *Structure* 18, 787–797.

Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, R.H., Kim, J.N., Link, K.H., and Breaker, R.R. (2008). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* 321, 411–413.

Tinoco, I., Chen, G., and Qu, X. (2010). RNA reactions one molecule at a time. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003624.

Tomšič, J., McDaniel, B.M., Grundy, F.J., and Henkin, T.M. (2008). Natural variability in S-adenosylmethionine (SAM)-dependent riboswitches: S-box elements in *Bacillus subtilis*

exhibit differential sensitivity to SAM *in vivo* and *in vitro*. *J. Bacteriol.* *190*, 823–833.

Trausch, J.J., Xu, Z., Edwards, A.L., Reyes, F.E., Ross, P.E., Knight, R., and Batey, R.T. (2014). Structural basis for diversity in the SAM clan of riboswitches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 6624–6629.

Vogel, J., and Wagner, E.G.H. (2007). Target identification of small noncoding RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 262–270.

Wachter, A., Tunc-Ozdemir, M., Grove, B.C., Green, P.J., Shintani, D.K., and Breaker, R.R. (2007). Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *Plant Cell* *19*, 3437–3450.

Wang, J.X., Elaine R., Dianali Rivera Morales, and Lim, J. (2008). Riboswitches that Sense S-adenosylhomocysteine and Activate Genes Involved in Coenzyme Recycling. *Mol Cell.* *29*, 691–702.

Watson, J.D. (2004). The structure of DNA and RNA. *Molecular Biology of the Gene*. T.A. Baker. eds. (Harlow, UK, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 432–456.

Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature* *171*, 737–738.

Watson, P.Y., and Fedor, M.J. (2011). The glmS riboswitch integrates signals from activating and inhibitory metabolites *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 359–363.

Weinberg, Z., Regulski, E.E., Hammond, M.C., Barrick, J.E., Yao, Z., Ruzzo, W.L., and Breaker, R.R. (2008). The aptamer core of SAM-IV riboswitches mimics the ligand-binding site of SAM-I riboswitches. *RNA* *14*, 822–828.

Winkler, W., Nahvi, A., and Breaker, R.R. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* *419*, 952–956.

Winkler, W.C., Nahvi, A., Sudarsan, N., Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2003). An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 701–707.

Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J.A., and Breaker, R.R. (2004). Control of

gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* 428, 281–286.

